

担当者	G·M	Pat·M	部長
-----	-----	-------	----

 PATENT COOPERATION TREATY

PCT

 NOTIFICATION CONCERNING
 SUBMISSION OR TRANSMITTAL
 OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

 TAKAHASHI, Shuichi
 Osaka Plant of Takeda Chemical
 Industries, Ltd.
 17-85, Jusohonmachi 2-chome
 Yodogawa-ku
 Osaka-shi
 Osaka 532-0024
 JAPON

受付

00.7.31

知的財産部

Date of mailing (day/month/year) 18 July 2000 (18.07.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2609WO0P	
International application No. PCT/JP00/03221	International filing date (day/month/year) 19 May 2000 (19.05.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 20 May 1999 (20.05.99)
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al	

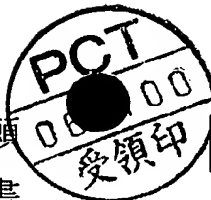
- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
20 May 1999 (20.05.99)	11/140229	JP	07 July 2000 (07.07.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer <div style="text-align: right;">Tessadel PAMPLIEGA <i>Tdp</i></div>
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)





特許協力条約に基づく国際出願
国際予備審査請求書

第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し、
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。

国際予備審査機関記入欄

国際予備審査機関の確認	請求書の受理の日	2609 (JPO提出分は2000年)
-------------	----------	---------------------

第 I 欄 国際出願の表示

出願人又は代理人の書類記号 2594WO0P

国際出願番号 PCT/JP00/03221	国際出願日 (日. 月. 年) 19.05.00	優先日 (最先のもの) (日. 月. 年) 20.05.99
--------------------------	-----------------------------	-----------------------------------

発明の名称

新規ポリペプチド

第 II 欄 出願人

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

武田薬品工業株式会社
TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
〒541-0045 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,
OSAKA 541-0045 JAPAN

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍(国名): 日本国 Japan

住所(国名): 日本国 Japan

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

伊藤康明 ITOH Yasuaki
〒300-0832 日本国茨城県土浦市桜ヶ丘町36番地16
36-16, Sakuragaoka-machi, Tsuchiura-shi, IBARAKI 300-0832 JAPAN

国籍(国名): 日本国 Japan

住所(国名): 日本国 Japan

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

茂木伸一 MOGI Shinichi
〒302-0121 日本国茨城県北相馬郡守谷町みずき野1丁目17番地16
17-16, Mizukino 1-chome, Moriya-machi, Kitasoma-gun, IBARAKI 302-0121 JAPAN

国籍(国名): 日本国 Japan

住所(国名): 日本国 Japan

☒ その他の出願人が続葉に記載されている。

THIS PAGE BLANK (U8PT0)

第 II 欄の続き 出願人

この第 II 欄の続きを使用しない時は、この用紙を国際予備審査請求書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

田中秀幸 TANAKA Hideyuki
〒305-0821 日本国茨城県つくば市春日 1 丁目 7 番地 9 - 1 3 0 2 号
7-9-1302, Kasuga 1-chome, Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0821 JAPAN

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

(氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

大久保尚一 OHKUBO Shoichi
〒300-1234 日本国茨城県牛久市中央 1 丁目 4 番地 2 3
4-23, Chuo 1-chome, Usiku-shi, IBARAKI 300-1234 JAPAN

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

(氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

大儀和宏 OGI Kazuhiro
〒305-0045 日本国茨城県つくば市梅園 2 丁目 1 6 番地 1 - 2 0 6 号
16-1-206, Umezono 2-chome, Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0045 JAPAN

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

(氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍 (国名):

住所 (国名):

☐ その他の出願人が他の続葉に記載されている。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅲ欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

☒ 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。

☐ 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。

☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

11404 弁理士 高橋秀一 TAKAHASHI Shuichi
11045 弁理士 内山 務 UCHIYAMA Tsutomu

電話番号:

03-3278-2235

ファクシミリ番号:

03-3278-2222

加入電信番号:

〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内
c/o Osaka Plant of Takeda Chemical Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi, OSAKA
532-0024 JAPAN

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

第Ⅳ欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述: *

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☒ 出願時の国際出願を基礎とすること。

☐ 明細書に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 請求の範囲に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正(添付した説明書も含む)を基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 図面に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2 ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲に関する補正を差し替えることによって考慮されることを望む。

3 ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過まで延期されることを望む (ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の写しの受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く (規則69.1(d)). (この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができる。)

*. 記入がない場合は、1)補正がないか又は国際予備審査機関が補正(原本又は写し)を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査を開始され、2)国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正(原本又は写し)を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は 日 本 語 であり、

☒ 国際出願提出時の言語である。

☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。

☐ 国際出願の公開の言語である。

☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

第Ⅴ欄 国の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国(即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第Ⅱ章に拘束されている国)を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第VI欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

国際予備審査機関記入欄

- | | |
|---|---|
| 1. 国際出願の翻訳文 | 枚 |
| 2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書 | 枚 |
| 3. 特許協力条約第19条の規定に基づく補正書
(又は、要求された場合は翻訳文) の写し | 枚 |
| 4. 特許協力条約第19条の規定に基づく説明書
(又は、要求された場合は翻訳文) の写し | 枚 |
| 5. 書簡 | 枚 |
| 6. その他(書類名を具体的に記載する): | 枚 |

受領

未受領

☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

- | | |
|---|---|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙 | 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し |
| <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 | 4. <input type="checkbox"/> 記名押印(署名)に関する説明書 |
| <input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込を証明する書面 | 5. <input type="checkbox"/> スクレオチド又はアミノ酸配列表
(フレキシブルディスク) |
| 2. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 | 6. <input type="checkbox"/> その他(書類名を具体的に記載する): |

第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名(名称)記載し、その次に押印する。

高橋 秀一



内山 務



国際予備審査機関記入欄

1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

2. 規則60.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4、5の項目にはあてはまらない。☐ 出願人に通知した。4. ☐ 規則80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

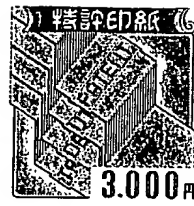
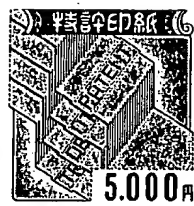
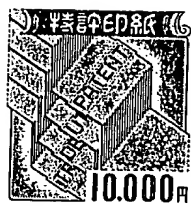
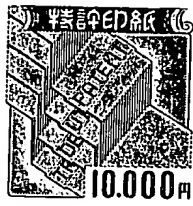
P C T

手 数 料 計 算 用 紙

国際予備審査請求書の附属書

国際出願番号 PCT/JP00/03221	国際予備審査機関記入欄 国際予備審査機関の日付印
出願人又は代理人の書類記号 2609WO0P	
出願人 武田薬品工業株式会社	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;"> 所定の手数料の計算 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 60%;"> 1. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律(国内法) 第18条第1項第4号の規定による手数料 (予備審査請求料) (注1) </div> <div style="width: 35%; text-align: right; border: 1px solid black; padding: 5px;"> 28,000 円 P </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 10px;"> <div style="width: 60%;"> 2. 取扱手数料 (注2)..... </div> <div style="width: 35%; text-align: right; border: 1px solid black; padding: 5px;"> 16,500 円 H </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 10px;"> <div style="width: 60%;"> 3. 所定の手数料の合計 P及びHに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入... </div> <div style="width: 35%; text-align: right; border: 1px solid black; padding: 5px;"> 44,500 円 </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 10px;"> <div style="width: 60%;"></div> <div style="width: 35%; text-align: right; border: 1px solid black; padding: 5px;"> 合 計 </div> </div>	
<p>(注1) 法第18条第1項第4号の規定による手数料については、特許印紙をもって納付しなければならない。</p> <p>(注2) 取扱手数料については、国際予備審査機関である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振り込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。</p>	

THIS PAGE BLANK (UPTD)



予備審査請求料

28,000円

THIS PAGE BLANK (USPTO)

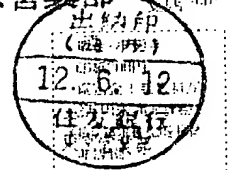
振込みを証明する書面

お手続き日 12 年 6 月 12 日		振込金受取書 (兼振込手数料受取書)		お振込方法 住友本支店宛	他行宛 宛 振 込
お振込先	フリガナ トウキョウ	はしあから 五文字に記入ください	フリガナ 内幸町	はしあから 五文字に記入ください	預金種目 9 1. 普通 4. 貯蓄 2. 当座 9. その他 非居住者用普通預金
お振込先	東京三菱 銀行		内幸町 支店		お振込金額 0473286
お振込先	フリガナ ワイポーピーシーティー、ジュネーブ				お振込金額 16500
お振込先	WIPG-PCT, Geneva 様				
お振込先	東京都中央区日本橋二丁目12番10号				
お振込先	フリガナ タケダヤクヒンコウギョウカブシキガイシャ				
お振込先	武田薬品工業株式会社 様				
お振込先	(ご連絡先お電話) 03-3278-2286				

○振込依頼書に記載の振込の準備が完了した場合には、振込等のために振り込みが迅速なことがあります。
○お振込み、お振込みまたはお振込みの振込等やその他の事由によって振込が滞ることもありますが、ご了承ください。

株式会社 住友銀行

東京営業部



このたびは住友銀行をご利用いただきまして、誠にありがとうございました。今後とも引き続きお引き立て賜りますよう、お願い申し上げます。お振込みは早くて便利な自動サービスをご利用ください。現金でのお振込みは、平日 午後6時までお取り扱いいたします。キャッシュカードでのお振込みは、平日6時以降、土・日曜日、祝日もお取り扱いいたします。(一都店舗を除く)

取扱手数料

16,500円

THIS PAGE BLANK (USPTO)

担当者	G・M		Pat・M	部長

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社 知的財産部

01.1.-7

PCT見解書

(法第13条)
[PCT規則66]

受付

00.11.-9

知的財産部

発送日
(日.月.年)

07.11.00

出願人又は代理人
の書類記号

2609WO0P

応答期間

上記発送日から 2ヶ月以内

国際出願番号

PCT/JPO0/03221

国際出願日

(日.月.年) 19.05.00

優先日

(日.月.年) 19.05.99

国際特許分類 (IPC) Int.Cl¹ C07K14/47, C12P21/02, C07K16/18, C12P21/08,
G01N33/50, G01N33/15, G01N33/563, A61K38/16, A61K39/395

出願人 (氏名又は名称)

武田薬品工業株式会社

- これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。
- この見解書は、次の内容を含む。
 - ☒ 見解の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
 - ☒ 発明の単一性の欠如
 - ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☒ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☒ 国際出願に対する意見
- 出願人は、この見解書に応答することが求められる。
いつ? 上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。
どのように? 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。
なお 補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。
応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。
- 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 20.09.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
上 條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | | |
|-------------------------------------|---|-------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- ☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- ☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
- ☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- ☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項
- ☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

THIS PAGE BLANK (USPTO)

IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求め（様式PCT/IPEA/405）に対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☐ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

特許請求の範囲第1項に記載の配列番号1ないし15から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドに共通の事項は「分泌性ポリペプチド」である。

PCT規則13.3によると、発明の単一性の判断はこれらの発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われるべきものである。

ここで、分泌性ポリペプチドは本出願前周知であると認められるから、当該共通事項は先行技術の域を出るものではなく、PCT規則13.2における特別な技術的事項であるとはいえず、請求の範囲1に記載された発明のうち配列番号1～15に係るものは単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえないので、15個の発明からなる発明群であると認める。

3. したがって、この見解書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- ☒ すべての部分
- ☐ 請求の範囲 _____ に関する部分

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲	7	有
請求の範囲	1-6, 8	無

進歩性 (IS)

請求の範囲		有
請求の範囲	1-8	無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲	1-8	有
請求の範囲		無

2. 文献及び説明

請求の範囲 1-3

文献1 (JP, 10-70986, A) には請求項1及び配列番号6としてヒトTh1蛋白質が記載されている。当該蛋白質のアミノ酸配列は本願配列番号3に示されるアミノ酸配列と配列中の1~223番目のアミノ酸番号において99%以上の同一性を有するので、本願配列番号3に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなる蛋白質であるといえる。

また、文献1の請求項6~11及び明細書12~14ページには形質転換体を用いたヒトTh1蛋白質の製造法や当該蛋白質に対する抗体が開示されている。

よって、当該文献1に記載された発明は請求の範囲1~3に係る発明と区別することができない。

請求の範囲 4-8

文献1にはヒトTh1蛋白質と相互作用する化合物のスクリーニングやスクリーニングによって得られた化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲4-8に係る発明は当業者が文献1に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲 1-6, 8

文献2 (WO, 98/54963, A2) にはヒト由来のNO: 115 (HDT AW95) と名付けられた蛋白質が配列番号125として開示されており (第90~91ページ、Table 1)、また開示された蛋白質あるいはそれをコードするDNAを用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、スクリーニング方法、医薬品への適用方法が記載されている。

文献1において、配列番号125として開示された全長1288残基の核酸配列のうち残基番号130から851の核酸配列は、本願配列番号: 15に記載の蛋白質をコードする核酸配列と90%以上一致する。

よって、文献2に記載の蛋白質NO: 115は本願配列番号7に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書(PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 00/05367, A2 「E, X」	03.02.00	22.07.99	24.07.98
WO, 99/24836, A1 「E, X」	20.05.99	04.11.98	07.11.97
WO, 99/31131, A2 「E, X」	24.06.99	18.12.98	18.12.97
WO, 99/67385, A1 「E, X」	29.12.99	22.06.99	23.06.98
WO, 99/63088, A2 「E, X」	09.12.99	02.06.99	02.06.98
WO, 99/57144, A2 「E, X」	11.11.99	04.05.99	05.05.98
US, 5958726, A 「E, X」	28.09.99	02.06.97	

2. 書面による開示以外の開示(PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

本願発明に係るポリペプチドについては生体内で液性因子として存在するため、本発明のポリペプチドなどまたは本発明のDNAなどに異常があったり、欠損している場合あるいは発現量が異常に減少または高進している場合、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化器疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの治療・予防剤などの医薬として使用することができる旨記載されている。

しかしながら、本願発明に係るどのポリペプチドが具体的にどのような疾患に関与しているかについては本願明細書に何ら開示されておらず、また当業者にとってその関係は自明であるとはいえない。よって当業者といえども本願発明に係るポリペプチドを具体的な医薬品として用いることは出来ない。

したがって、請求の範囲7-8に係る発明について本願明細書には十分に裏付けがない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

よって、当該文献2に記載された発明は請求の範囲1～6, 8に係る発明と区別することができない。

請求の範囲7

文献2には蛋白質NO: 115と相互作用する化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲7に係る発明は当業者が文献2に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲1-3

文献3(WO, 98/08870, A1)にはヒト由来のサイトカインであるインターロイキン19が配列番号1及び2として開示されており、また開示されたインターロイキン19あるいはそれをコードするDNAを用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、医薬品への適用方法が記載されている。

文献3において、配列番号2として開示された全長177残基のアミノ酸配列のうち残基番号24から80のアミノ酸配列は、本願配列番号: 8に記載の蛋白質をコードするアミノ酸配列の残基番号1から104と完全に一致する。

よって、文献3に記載のインターロイキン19は本願配列番号8に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

よって、当該文献3に記載された発明は請求の範囲1～3に係る発明と区別することができない。

請求の範囲4-8

文献3にはインターロイキン19と相互作用する化合物を医薬品として利用することやスクリーニングを行うことは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲4-8に係る発明は当業者が文献3に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲1-6, 8

文献4(WO, 98/39948, A2)にはヒト由来のNO: 165(HEAAL31)と名付けられた蛋白質が配列番号477として開示されており(第104～105ページ、Table 1)、また開示された蛋白質あるいはそれをコードするDNAを用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、スクリーニング方法、医薬品への適用方法が記載されている。

文献4において、配列番号477として開示された全長177残基のアミノ酸配列のうち残基番号1から104のアミノ酸配列は、本願配列番号: 8に記載の蛋白質をコードするアミノ酸配列の残基番号1から104と完全に一致する。

よって、文献4に記載のNO: 165は本願配列番号8に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

よって、当該文献4に記載された発明は請求の範囲1-6, 8に係る発明と区別することができない。

請求の範囲7

文献4には蛋白質NO: 165と相互作用する化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニング

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

を行うことは常套手段であるから、請求の範囲 7 に係る発明は当業者が文献 4 に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲 1-6, 8

文献 5 (WO, 99/22243, A1) にはヒト由来の NO: 116 (HKACD 58) と名付けられた蛋白質が配列番号 126, 275 として開示されており (第 171~173 ページ、Table 1)、また開示された蛋白質あるいはそれをコードする DNA を用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、スクリーニング方法、医薬品への適用方法が記載されている。

文献 5 において、配列番号 275 として開示された全長 155 残基のアミノ酸配列のうち残基番号 1 から 155 のアミノ酸配列は、本願配列番号: 12 に記載の蛋白質をコードするアミノ酸配列の残基番号 1 から 155 と完全に一致する。

よって、文献 5 に記載の NO: 165 は本願配列番号 12 に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

よって、当該文献 5 に記載された発明は請求の範囲 1-6, 8 に係る発明と区別することができない。

請求の範囲 7

文献 5 には蛋白質 NO: 165 と相互作用する化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲 7 に係る発明は当業者が文献 5 に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲 1-6, 8

文献 6 (WO, 98/42738, A1) にはヒト由来の NO: 47 (HKACD 58) と名付けられた蛋白質が配列番号 57, 171 として開示されており (第 44 ページ、Table 1)、また開示された蛋白質あるいはそれをコードする DNA を用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、スクリーニング方法、医薬品への適用方法が記載されている。

文献 6 において、配列番号 171 として開示された全長 69 残基のアミノ酸配列のうち残基番号 1 から 69 のアミノ酸配列は、アミノ酸を Xaa として開示されていない 5 残基を除き、本願配列番号: 13 に記載の蛋白質をコードするアミノ酸配列の全体と完全に一致する。

よって、文献 6 に記載の NO: 47 は本願配列番号 13 に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

よって、当該文献 6 に記載された発明は請求の範囲 1-6, 8 に係る発明と区別することができない。

請求の範囲 7

文献 5 には蛋白質 NO: 47 と相互作用する化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲 7 に係る発明は当業者が文献 6 に記載された発明から容易に想到しうるものである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 VI 欄の続き

<u>出願番号 特許番号</u>	<u>公知日 (日. 月. 年)</u>	<u>出願日 (日. 月. 年)</u>	<u>優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)</u>
WO, 00/06698, A1 「E, X」	10.02.00	29.07.99	30.07.98
WO, 99/31117, A1 「E, X」	24.06.99	17.12.98	18.12.97
WO, 99/46289, A1 「E, X」	03.09.99	11.03.99	12.03.98

THIS PAGE BLANK (USPTO)

127
Translation

ENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2609WO0P	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/03221	International filing date (day/month/year) 19 May 2000 (19.05.00)	Priority date (day/month/year) 20 May 1999 (20.05.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/47, C12P 21/02, C07K 16/18, C12P 21/08, G01N 33/50, 33/15, 33/563, A61K 38/16, 39/395		
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 13 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 06 July 2000 (06.07.00)	Date of completion of this report 25 January 2001 (25.01.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03221

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03221

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet for continuation of Box IV. 1.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____

THIS PAGE BLANK (11SP70)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT 00/03221

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

The feature common to the polypeptides in Claim 1 including at least one amino acid sequence selected from SEQ ID NO:1-15 is that they are "secretory peptides".

According to PCT rule 13.3, the determination of unity of the invention shall be made without regard to whether the inventions are claimed in separate claims or as alternatives within a single claim.

In this case, secretory peptides were commonly known before filing the present application, and therefore the common feature does not extend beyond the prior art and cannot be considered a "special technical feature" as stipulated in PCT rule 13.2. Therefore, the peptides of SEQ ID NO:1-15 in the invention described in Claim 1 are not a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, but are a group of 15 individual inventions.

THIS PAGE BLANK (U8PT0)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/03221

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	7	YES
	Claims	1-6, 8	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-8	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-3

Document 1 (JP, 10-70986, A), Claim 1 and SEQ ID NO:6, discloses human Th1 protein. The amino acid sequence of said protein shows at least 99% homology with the amino acid sequence of residues 1-223 in the amino acid sequence presented as SEQ ID NO:3 in the present application and hence the protein has substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence presented in SEQ ID NO:3 of the present application.

Document 1, Claims 6-11 and specification pages 12-14, also discloses a process for producing human Th1 protein using transformed cells, and an antibody against said protein.

Therefore, an invention described in Document 1 is indistinguishable from the invention according to Claims 1-3.

Claims 4-8

Document 1 does not disclose screening for compounds which interact with human Th1 protein, or pharmaceutical use of compounds obtained by screening; however, screening of pharmaceutical products using human proteins is routine practice, and therefore the inventions described in Claims 4-8 could easily be conceived by a person skilled in the art from the inventions disclosed in Document 1.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Claims 1-6 and 8

Document 2 (WO, 98/54963, A2), SEQ ID NO:125, discloses a human protein designated NO: 115 (HDTAW95) (pages 90-91, Table 1); it also discloses vectors and transformed cells in which the disclosed protein or DNA coding the same is used, a process for producing the protein, an antibody, a screening method and pharmaceutical application.

Of the entire length of 1288 nucleotides in the nucleic acid sequence disclosed as SEQ ID NO:125 in Document 2, the nucleic acid sequence of nucleotides 130 to 851 shows at least 90% correspondence with nucleic acid coding the protein of SEQ ID NO:15 in the present application.

Therefore, protein NO: 115 disclosed in Document 2 contains an amino acid sequence which is substantially the same as the amino acid sequence presented in SEQ ID NO:7 in the present application.

Therefore, inventions disclosed in Document 2 are indistinguishable from the inventions disclosed in Claims 1-6 and 8.

Claim 7

Document 2 does not disclose the pharmaceutical use of compounds which interact with protein NO: 115; however, screening of pharmaceutical products using human proteins is routine, and therefore a person skilled in the art could easily conceive of the invention described in Claim 7 from inventions disclosed in Document 2.

Claims 1-3

Document 3 (WO, 98/08870, A1), SEQ ID NO:1 and 2, discloses the human cytokine interleukin 19; it also discloses vectors and transformed cells in which the disclosed interleukin 19 or DNA coding the same is used, a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

process for producing the protein, an antibody and pharmaceutical application.

Of the entire length of the amino acid sequence of 177 residues disclosed as SEQ ID NO:2 in Document 3, the amino acid sequence of residues -24 to 80 agrees completely with residues 1 to 104 of the amino acid sequence of the protein described by SEQ ID NO:8 in the present application.

Therefore, interleukin 19 disclosed in Document 3 is a protein including an amino acid sequence substantially the same as the amino acid sequence presented in SEQ ID NO:8 in the present application.

Therefore, inventions disclosed in Document 3 are indistinguishable from the inventions described in Claims 1-3.

Claims 4-8

Document 3 does not disclose the pharmaceutical use of compounds which interact with interleukin 19; however, screening of pharmaceutical products using human proteins is routine, and therefore a person skilled in the art could easily conceive of the invention described in Claims 4-8 from inventions disclosed in Document 3.

Claims 1-6 and 8

Document 4 (WO, 98/39948, A2), SEQ ID NO:477, discloses a human protein designated NO: 165 (HEAAL31) (pages 104-105, Table 1); it also discloses vectors and transformed cells in which the disclosed protein or DNA coding the same is used, a process for producing the protein, an antibody, a screening method and pharmaceutical applications.

Of the entire length of 177 residues in the amino acid sequence disclosed as SEQ ID NO:477 in Document 4, the amino acid sequence of residues 1 to 104 agrees completely with residues 1 to 104 of the amino acid

THIS PAGE BLANK (USPTO)

sequence of the protein described by SEQ ID NO:8 in the present application.

Therefore, protein NO: 165 disclosed in Document 4 contains an amino acid sequence which is substantially the same as the amino acid sequence presented in SEQ ID NO:8 in the present application.

Therefore, inventions disclosed in Document 4 are indistinguishable from the inventions disclosed in Claims 1-6 and 8.

Claim 7

Document 4 does not disclose the pharmaceutical use of compounds which interact with protein NO: 165; however, screening of pharmaceutical products using human proteins is routine, and therefore a person skilled in the art could easily conceive of the invention described in Claim 7 from inventions disclosed in Document 4.

Claims 1-6 and 8

Document 5 (WO, 99/22243, A1), SEQ ID NO:126 and 275, discloses a human protein designated NO: 116 (HKACD58) (pages 171-173, Table 1); it also discloses vectors and transformed cells in which the disclosed protein or DNA coding the same is used, a process for producing the protein, an antibody, a screening method and pharmaceutical application.

Of the entire length of 155 residues in the amino acid sequence disclosed as SEQ ID NO:275 in Document 5, the amino acid sequence of residues 1 to 155 agrees completely with residues 1 to 155 of the amino acid sequence of the protein described by SEQ ID NO:12 in the present application.

Therefore, protein NO: 116 disclosed in Document 5 contains an amino acid sequence which is substantially the same as the amino acid sequence presented in SEQ ID NO:12 in the present application.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Therefore, inventions disclosed in Document 5 are indistinguishable from the inventions disclosed in Claims 1-6 and 8.

Claim 7

Document 5 does not disclose the pharmaceutical use of compounds which interact with protein NO: 116; however, screening of pharmaceutical products using human proteins is routine, and therefore a person skilled in the art could easily conceive of the invention described in Claim 7 from inventions disclosed in Document 5.

Claims 1-6 and 8

Document 6 (WO, 98/42738, A1), SEQ ID NO:57 and 171, discloses a human protein designated NO: 47 (HKACD58) (page 44, Table 1); it also discloses vectors and transformed cells in which the disclosed protein or DNA coding the same is used, a process for producing the protein, an antibody, a screening method and pharmaceutical applications.

Of the entire length of 69 residues in the amino acid sequence disclosed as SEQ ID NO:177 in Document 6, the amino acid sequence of residues 1 to 69 agrees completely with the entire amino acid sequence of the protein described by SEQ ID NO:13 in the present application, except for 5 residues which are not disclosed, with the amino acids given as Xaa.

Therefore, protein NO: 47 disclosed in Document 6 contains an amino acid sequence which is substantially the same as the amino acid sequence presented in SEQ ID NO:13 in the present application.

Therefore, inventions disclosed in Document 6 are indistinguishable from the inventions disclosed in Claims 1-6 and 8.

Claim 7

Document 5 does not disclose the pharmaceutical use

THIS PAGE BLANK (USPTO)

of compounds which interact with protein NO: 47; however, screening of pharmaceutical products using human proteins is routine, and therefore a person skilled in the art could easily conceive of the invention described in Claim 7 from inventions disclosed in Document 6.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03221

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No.
Patent No.

Publication date
(day/month/year)

Filing date
(day/month/year)

Priority date (valid claim)
(day/month/year)

See supp. sheet

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure

Date of non-written disclosure
(day/month/year)

Date of written disclosure
referring to non-written disclosure
(day/month/year)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03221

Supplemental sheet of Box VI. 1.

Continuation of Box VI. 1.

WO, 00/05367, A2 [E, X]	03.02.00	22.07.99	24.07.98
WO, 99/24836, A1 [E, X]	20.05.99	04.11.98	07.11.97
WO, 99/31131, A2 [E, X]	24.06.99	18.12.98	18.12.97
WO, 99/67385, A1 [E, X]	29.12.99	22.06.99	23.06.98
WO, 99/63088, A2 [E, X]	09.12.99	02.06.99	02.06.98
WO, 99/57144, A2 [E, X]	11.11.99	04.05.99	05.05.98
US, 5958726, A [E, X]	28.09.99	02.06.97	
WO, 00/06698, A1 [E, X]	10.02.00	29.07.99	30.07.98
WO, 99/31117, A1 [E, X]	24.06.99	17.12.98	18.12.97
WO, 99/46289, A1 [E, X]	03.09.99	11.03.99	12.03.98

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

It is indicated that the polypeptides described in the inventions in the present application exist as liquid factors in the body, and therefore, can be used as pharmaceuticals, for example for treating or preventing problems such as cancer, immune disorders, respiratory disorders, digestive disorders, circulatory disorders, endocrine disorders, infections or nervous conditions and psychiatric illness, when there are abnormalities or deficiencies in peptides of the present invention or the like, or DNA of the present invention or the like, or when expression thereof is abnormally depressed or elevated.

However, the description of the present application does not disclose the sort of disorders that the polypeptides described in the inventions of the application actually contribute to, and this relationship is not obvious to a person skilled in the art. Therefore, a person skilled in the art would be unable to use polypeptides described in the inventions of the present application as specific pharmaceutical products.

Therefore, the inventions described in Claims 7 and 8 of the present application are not fully supported in the description.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP00/03221

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12P21/02, C07K16/18, C12P21/08, G01N33/50
 G01N33/15, G01N33/563, A61K38/16, A61K39/395
 //C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/00-19/00, C12N15/00-90, C12P21/00-08,
 G01N33/00-98, A61K38/00-48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG)
 SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX PY	WO, 00/05367, A2 (SAGAMI CHEMICAL RESERCH CENTER), 03 February, 2000 (03.02.00) (Family: none)	1, 2 3-7
PX PY	WO, 99/24836, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 20 May, 1999 (20.05.99) & AU, 9913037, A	1-6, 8 7
X Y	JP, 10-70986, A (BML K.K.), 17 March, 1998 (17.03.98) & US, 5962319, A	1-3 4-8
PX PY	WO, 99/31131, A2 (ZYMOGENETICS, INC.), 24 June, 1999 (24.06.99) & AU, 9920024, A	1-3 4-8
PX PY	WO, 99/67385, A1 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.), 29 December, 1999 (29.12.99) & AU, 9948268, A	1-5 6-8
PX PY	WO, 99/63088, A2 (GENENTECH, INC.), 09 December, 1999 (09.12.99) & AU, 9943286, A	1-3 4-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not
 considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing
 date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
 cited to establish the publication date of another citation or other
 special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
 means
 "P" document published prior to the international filing date but later
 than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
 priority date and not in conflict with the application but cited to
 understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive
 step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered to involve an inventive step when the document is
 combined with one or more other such documents, such
 combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 29 August, 2000 (29.08.00)

Date of mailing of the international search report
 12 September, 2000 (12.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03221

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 99/57144, A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.), 11 November, 1999 (11.11.99) & AU, 9938859, A	1-8
PX	US, 5958726, A (Genetics Institute, Inc.),	1,2
PY	28 September, 1999 (28.09.99) (Family: none)	3-8
PX	WO, 00/06698, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 10 February, 2000 (10.02.00) (Family: none)	1-6,8 7
X	WO, 98/54963, A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 10 December, 1998 (10.12.98) & AU, 9878120, A	1-6,8 7
X	WO, 98/08870, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.),	1-3,8
Y	05 March, 1998 (05.03.98) & AU, 9671552, A & EP, 963377, A1 & US, 5985614, A	4-7
X	WO, 98/39448, A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.),	1-6,8
Y	11 September, 1998 (11.09.98) & AU, 9865453, A & AU, 9891304, A & EP, 972030, A2	7
PX	WO, 99/31117, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.),	1-6,8
PY	24 June, 1999 (24.06.99) & AU, 9923064, A	7
PX	WO, 99/46289, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.),	1-6,8
PY	16 September, 1999 (16.09.99) & AU, 9930067, A	7
X	WO, 99/22243, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.),	1-6,8
Y	06 May, 1999 (06.05.99) & AU, 9912734, A	7
X	WO, 98/42738, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.),	1-6,8
Y	01 October, 1998 (01.10.98) & AU, 9865646, A & EP, 970110, A1	7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP00/03221

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

A group of inventions as set forth in claim 1 are not so linked as to form a single general inventive concept. The reason therefor is as follows. The same also applies to inventions as set forth in claims 2 to 8 wherein claim 1 is cited substantially.

[Reason] Polypeptides containing at least one amino acid sequence selected from among those represented by SEQ ID NOS:1 to 15 are considered as a group of inventions exclusively in the point of being "novel secretory peptides" in the description of the present application. However, the term "secretory" means neither the structure (amino acid sequence) of polypeptides nor major function thereof but merely a characteristic thereof (i.e., being secretory or not). In addition, the 15 polypeptides as described above are not identical with each other in the major parts of their amino acid sequences.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C07K14/47, C12P21/02, C07K16/18, C12P21/08, G01N33/50
G01N33/15, G01N33/563, A61K38/16, A61K39/395
//C12N15/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C07K14/00~19/00, C12N15/00~90, C12P21/00~08,
G01N33/00~98, A61K38/00~48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG)
SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX PY	WO,00/05367, A2 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER) 03.02月.2000 (03.02.00) ファミリーなし	<u>1, 2</u> 3-7
PX PY	WO,99/24836, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 20.05月.1999 (20.05.99) & AU, 9913037, A	<u>1-6, 8</u> 7
X Y	JP, 10-70986, A (株式会社ビー・エム・エル) 17.03月.1998 (17.03.98) & US, 5962319, A	<u>1-3</u> 4-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.08.00

国際調査報告の発送日

12.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

4B 8931

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX PY	WO, 99/31131, A2 (ZYMOGENETICS, INC.) 24. 06月. 1999 (24. 06. 99) & AU, 9920024, A	<u>1 - 3</u> 4 - 8
PX PY	WO, 99/67385, A1 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 29. 12月. 1999 (29. 12. 99) & AU, 9948268, A	<u>1 - 5</u> 6 - 8
PX PY	WO, 99/63088, A2 (GENENTECH, INC.) 09. 12月. 1999 (09. 12. 99) & AU, 9943286, A	<u>1 - 3</u> 4 - 8
PX	WO, 99/57144, A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 11. 11月. 1999 (11. 11. 99) & AU, 9938859, A	1 - 8
PX PY	US, 5958726, A (Genetics Institute, Inc.) 28. 09月. 1999 (28. 09. 99) ファミリーなし	<u>1, 2</u> 3 - 8
PX	WO, 00/06698, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 10. 02月. 2000 (10. 02. 00) ファミリーなし	<u>1 - 6, 8</u> 7
X	WO, 98/54963, A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 10. 12月. 1998 (10. 12. 98) & AU, 9878120, A	<u>1 - 6, 8</u> 7
X Y	WO, 98/08870, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 05. 03月. 1998 (05. 03. 98) & AU, 9671552, A & EP, 963377, A1 & US, 5985614, A	<u>1 - 3, 8</u> 4 - 7
X Y	WO, 98/39448, A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 11. 09月. 1998 (11. 09. 98) & AU, 9865453, A & AU, 9891304, A & EP, 972030, A2	<u>1 - 6, 8</u> 7
PX PY	WO, 99/31117, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 24. 06月. 1999 (24. 06. 99) & AU, 9923064, A	<u>1 - 6, 8</u> 7
PX PY	WO, 99/46289, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 16. 09月. 1999 (16. 09. 99) & AU, 9930067, A	<u>1 - 6, 8</u> 7
X Y	WO, 99/22243, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 06. 05月. 1999 (06. 05. 99) & AU, 9912734, A	<u>1 - 6, 8</u> 7
X Y	WO, 98/42738, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 01. 10月. 1998 (01. 10. 98) & AU, 9865646, A & EP, 970110, A1	<u>1 - 6, 8</u> 7

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特許請求の範囲第1項に記載の一群の発明は、以下の理由により、単一の一般的発明概念を形成するように連関していない。なお、特許請求の範囲第2-8項に記載の各発明も、同第1項を実質的に引用していることから同じ理由がある。

【理由】 配列番号1ないし配列番号15から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、本願明細書中「新規分泌性ポリペプチド」という点でのみ、一群の発明ととらえられている。しかしながら、「分泌性」というのは、ポリペプチドの一側面として、分泌型か否かと単なる特徴だけであり、ポリペプチドの構造(アミノ酸配列)でも、主要機能でもない。しかも、上記15種類のポリペプチドのアミノ酸配列の主要部分が同一ではなく、作用機能も同一でもない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
[P C T 1 8 条、P C T 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 2 6 0 9 W O O P	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 3 2 2 1	国際出願日 (日.月.年) 1 9 . 0 5 . 0 0	優先日 (日.月.年) 2 0 . 0 5 . 9 9
出願人 (氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特許請求の範囲第1項に記載の一群の発明は、以下の理由により、単一の一般的発明概念を形成するように連関していない。なお、特許請求の範囲第2-8項に記載の各発明も、同第1項を実質的に引用していることから同じ理由がある。

【理由】 配列番号1ないし配列番号15から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、本願明細書中「新規分泌性ポリペプチド」という点でのみ、一群の発明ととらえられている。しかしながら、「分泌性」というのは、ポリペプチドの一側面として、分泌型か否かと単なる特徴だけであり、ポリペプチドの構造(アミノ酸配列)でも、主要機能でもない。しかも、上記15種類のポリペプチドのアミノ酸配列の主要部分が同一ではなく、作用機能も同一でもない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C07K14/47, C12P21/02, C07K16/18, C12P21/08, G01N33/50
G01N33/15, G01N33/563, A61K38/16, A61K39/395
//C12N15/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C07K14/00~19/00, C12N15/00~90, C12P21/00~08,
G01N33/00~98, A61K38/00~48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG)
SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>PX</u> <u>PY</u>	WO, 00/05367, A2 (SAGAMI CHEMICAL RESERCH CENTER) 03.02月.2000 (03.02.00) ファミリーなし	<u>1, 2</u> 3-7
<u>PX</u> <u>PY</u>	WO, 99/24836, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 20.05月.1999 (20.05.99) & AU, 9913037, A	<u>1-6, 8</u> 7
<u>X</u> <u>Y</u>	JP, 10-70986, A (株式会社ビー・エム・エル) 17.03月.1998 (17.03.98) & US, 5962319, A	<u>1-3</u> 4-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.08.00

国際調査報告の発送日

12.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>PX</u> <u>PY</u>	WO, 99/31131, A2 (ZYMOGENETICS, INC.) 24. 06月. 1999 (24. 06. 99) & AU, 9920024, A	<u>1 - 3</u> <u>4 - 8</u>
<u>PX</u> <u>PY</u>	WO, 99/67385, A1 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 29. 12月. 1999 (29. 12. 99) & AU, 9948268, A	<u>1 - 5</u> <u>6 - 8</u>
<u>PX</u> <u>PY</u>	WO, 99/63088, A2 (GENENTECH, INC.) 09. 12月. 1999 (09. 12. 99) & AU, 9943286, A	<u>1 - 3</u> <u>4 - 8</u>
<u>PX</u>	WO, 99/57144, A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 11. 11月. 1999 (11. 11. 99) & AU, 9938859, A	<u>1 - 8</u>
<u>PX</u> <u>PY</u>	US, 5958726, A (Genetics Institute, Inc.) 28. 09月. 1999 (28. 09. 99) ファミリーなし	<u>1, 2</u> <u>3 - 8</u>
<u>PX</u>	WO, 00/06698, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 10. 02月. 2000 (10. 02. 00) ファミリーなし	<u>1 - 6, 8</u> <u>7</u>
<u>X</u>	WO, 98/54963, A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 10. 12月. 1998 (10. 12. 98) & AU, 9878120, A	<u>1 - 6, 8</u> <u>7</u>
<u>X</u> <u>Y</u>	WO, 98/08870, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 05. 03月. 1998 (05. 03. 98) & AU, 9671552, A & EP, 963377, A1 & US, 5985614, A	<u>1 - 3, 8</u> <u>4 - 7</u>
<u>X</u> <u>Y</u>	WO, 98/39448, A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 11. 09月. 1998 (11. 09. 98) & AU, 9865453, A & AU, 9891304, A & EP, 972030, A2	<u>1 - 6, 8</u> <u>7</u>
<u>PX</u> <u>PY</u>	WO, 99/31117, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 24. 06月. 1999 (24. 06. 99) & AU, 9923064, A	<u>1 - 6, 8</u> <u>7</u>
<u>PX</u> <u>PY</u>	WO, 99/46289, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 16. 09月. 1999 (16. 09. 99) & AU, 9930067, A	<u>1 - 6, 8</u> <u>7</u>
<u>X</u> <u>Y</u>	WO, 99/22243, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 06. 05月. 1999 (06. 05. 99) & AU, 9912734, A	<u>1 - 6, 8</u> <u>7</u>
<u>X</u> <u>Y</u>	WO, 98/42738, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 01. 10月. 1998 (01. 10. 98) & AU, 9865646, A & EP, 970110, A1	<u>1 - 6, 8</u> <u>7</u>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

P C T

国際予備審査請求書の の受理通知書

受付

00.7.24

知的財産部

（法施行規則第54条第1項）

〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、
実施細則601(a)〕

PCT/JP00/03221

PE402

発送日（日、月、年）

18.07.00

出願人又は代理人

の書類記号

2609WOOP

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP00/03221

国際出願日（日、月、年）

19.05.00

優先日（日、月、年）

20.05.99

出願人（氏名又は名称）

武田薬品工業株式会社

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したことを通知する。

06日07月00年

2. この受理の日は次に示す日である。

☒ 管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則61.1(b)）

☐ 管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則59.3(e)）

☐ 国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日

3. ☐ 受理の日は、優先日から19箇月が経過している。

（注意） 国際予備審査請求書に記載した選択国の国内段階開始時期の優先日から30箇月まで（遅い官庁がある）の効果はない。（PCT第39条（1））したがって、国内段階移行の手続きは、優先日から20箇月以内（遅い官庁がある）に行わなければならない。（PCT第22条）
詳細については、PCT出願人の手引き・第II巻」を参照すること。

☐ この内容は、口頭又は電話により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に、この通知書の写しは国際事務局に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/IPEA/402（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

THIS PAGE BLANK (USPTO)

担当者	G・M		部長

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）
〔PCT規則71.1〕



発送日
（日・月・年）

06.02.01

重要な通知

出願人又は代理人
の書類記号

2609WOOP

国際出願番号

PCT/JPO0/03221

国際出願日

（日・月・年） 19.05.00

優先日

（日・月・年） 20.05.99

出願人（氏名又は名称）

武田薬品工業株式会社

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。

3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）

THIS PAGE BLANK (USPTO)

注 意

1. 文献の写しの請求について
国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

- (1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

- (2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒100 東京都千代田区霞が関3-4-2 商工会館・弁理士会館ビル

財団法人 日本特許情報機構 サービス課

TEL 03-3503-3900

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 2609WOOP	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/03221	国際出願日 (日.月.年) 19.05.00	優先日 (日.月.年) 20.05.99
国際特許分類(IPC) Int.Cl ¹ C07K14/47, C12P21/02, C07K16/18, C12P21/08, G01N33/50, G01N33/15, G01N33/563, A61K38/16, A61K39/395		
出願人(氏名又は名称) 武 田 薬 品 工 業 株 式 会 社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 9 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☒ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☒ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 06.07.00	国際予備審査報告を作成した日 25.01.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 上 條 肇	4B 9453
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | | |
|-------------------------------------|---|-------|--------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☐ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2 ☒ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

特許請求の範囲第1項に記載の配列番号1ないし15から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドに共通の事項は「分泌性ポリペプチド」である。

PCT規則13.3によると、発明の単一性の判断はこれらの発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われるべきものである。

ここで、分泌性ポリペプチドは本出願前周知であると認められるから、当該共通事項は先行技術の域を出るものではなく、PCT規則13.2における特別な技術的事項であるとはいえず、請求の範囲1に記載された発明のうち配列番号1～15に係るものは単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえないので、15個の発明からなる発明群であると認める。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

☒ すべての部分

☐ 請求の範囲 _____ に関する部分

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	7	有
	請求の範囲	1-6, 8	無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-8	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-3

文献1(JP, 10-70986, A)には請求項1及び配列番号6としてヒトTh1蛋白質が記載されている。当該蛋白質のアミノ酸配列は本願配列番号3に示されるアミノ酸配列と配列中の1~223番目のアミノ酸番号において99%以上の相同性を有するので、本願配列番号3に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなる蛋白質であるといえる。

また、文献1の請求項6~11及び明細書12~14ページには形質転換体を用いたヒトTh1蛋白質の製造法や当該蛋白質に対する抗体が開示されている。

よって、当該文献1に記載された発明は請求の範囲1~3に係る発明と区別することができない。

請求の範囲4-8

文献1にはヒトTh1蛋白質と相互作用する化合物のスクリーニングやスクリーニングによって得られた化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲4-8に係る発明は当業者が文献1に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲1-6, 8

文献2(WO, 98/54963, A2)にはヒト由来のNO:115(HDTA W95)と名付けられた蛋白質が配列番号125として開示されており(第90~91ページ、Table 1)、また開示された蛋白質あるいはそれをコードするDNAを用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、スクリーニング方法、医薬品への適用方法が記載されている。

文献1において、配列番号125として開示された全長1288残基の核酸配列のうち残基番号130から851の核酸配列は、本願配列番号:15に記載の蛋白質をコードする核酸配列と90%以上一致する。

よって、文献2に記載の蛋白質NO:115は本願配列番号7に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 00/05367, A2 「E, X」	03.02.00	22.07.99	24.07.98
WO, 99/24836, A1 「E, X」	20.05.99	04.11.98	07.11.97
WO, 99/31131, A2 「E, X」	24.06.99	18.12.98	18.12.97
WO, 99/67385, A1 「E, X」	29.12.99	22.06.99	23.06.98
WO, 99/63088, A2 「E, X」	09.12.99	02.06.99	02.06.98
WO, 99/57144, A2 「E, X」	11.11.99	04.05.99	05.05.98
US, 5958726, A 「E, X」	28.09.99	02.06.97	

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

本願発明に係るポリペプチドについては生体内で液性因子として存在するため、本発明のポリペプチドなどまたは本発明のDNAなどに異常があったり、欠損している場合あるいは発現量が異常に減少または高進している場合、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化器疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの治療・予防剤などの医薬として使用することができる旨記載されている。

しかしながら、本願発明に係るどのポリペプチドが具体的にどのような疾患に関与しているかについては本願明細書に何ら開示されておらず、また当業者にとってその関係は自明であるとはいえない。よって当業者といえども本願発明に係るポリペプチドを具体的な医薬品として用いることは出来ない。

したがって、請求の範囲7-8に係る発明について本願明細書には十分に裏付けがない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

よって、当該文献2に記載された発明は請求の範囲1～6, 8に係る発明と区別することができない。

請求の範囲7

文献2には蛋白質NO: 115と相互作用する化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲7に係る発明は当業者が文献2に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲1-3

文献3(WO, 98/08870, A1)にはヒト由来のサイトカインであるインターロイキン19が配列番号1及び2として開示されており、また開示されたインターロイキン19あるいはそれをコードするDNAを用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、医薬品への適用方法が記載されている。

文献3において、配列番号2として開示された全長177残基のアミノ酸配列のうち残基番号-24から80のアミノ酸配列は、本願配列番号: 8に記載の蛋白質をコードするアミノ酸配列の残基番号1から104と完全に一致する。

よって、文献3に記載のインターロイキン19は本願配列番号8に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

よって、当該文献3に記載された発明は請求の範囲1～3に係る発明と区別することができない。

請求の範囲4-8

文献3にはインターロイキン19と相互作用する化合物を医薬品として利用することやスクリーニングを行うことは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲4-8に係る発明は当業者が文献3に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲1-6, 8

文献4(WO, 98/39948, A2)にはヒト由来のNO: 165(HEAAL31)と名付けられた蛋白質が配列番号477として開示されており(第104～105ページ、Table 1)、また開示された蛋白質あるいはそれをコードするDNAを用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、スクリーニング方法、医薬品への適用方法が記載されている。

文献4において、配列番号477として開示された全長177残基のアミノ酸配列のうち残基番号1から104のアミノ酸配列は、本願配列番号: 8に記載の蛋白質をコードするアミノ酸配列の残基番号1から104と完全に一致する。

よって、文献4に記載のNO: 165は本願配列番号8に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

よって、当該文献4に記載された発明は請求の範囲1-6, 8に係る発明と区別することができない。

請求の範囲7

文献4には蛋白質NO: 165と相互作用する化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニング

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

を行うことは常套手段であるから、請求の範囲 7 に係る発明は当業者が文献 4 に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲 1-6, 8

文献 5 (WO, 99/22243, A1) にはヒト由来の NO: 116 (HKACD 58) と名付けられた蛋白質が配列番号 126, 275 として開示されており (第 171~173 ページ、Table 1)、また開示された蛋白質あるいはそれをコードする DNA を用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、スクリーニング方法、医薬品への適用方法が記載されている。

文献 5 において、配列番号 275 として開示された全長 155 残基のアミノ酸配列のうち残基番号 1 から 155 のアミノ酸配列は、本願配列番号: 12 に記載の蛋白質をコードするアミノ酸配列の残基番号 1 から 155 と完全に一致する。

よって、文献 5 に記載の NO: 165 は本願配列番号 12 に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

よって、当該文献 5 に記載された発明は請求の範囲 1-6, 8 に係る発明と区別することができない。

請求の範囲 7

文献 5 には蛋白質 NO: 165 と相互作用する化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲 7 に係る発明は当業者が文献 5 に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲 1-6, 8

文献 6 (WO, 98/42738, A1) にはヒト由来の NO: 47 (HKACD 58) と名付けられた蛋白質が配列番号 57, 171 として開示されており (第 44 ページ、Table 1)、また開示された蛋白質あるいはそれをコードする DNA を用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、スクリーニング方法、医薬品への適用方法が記載されている。

文献 6 において、配列番号 171 として開示された全長 69 残基のアミノ酸配列のうち残基番号 1 から 69 のアミノ酸配列は、アミノ酸を Xaa として開示されていない 5 残基を除き、本願配列番号: 13 に記載の蛋白質をコードするアミノ酸配列の全体と完全に一致する。

よって、文献 6 に記載の NO: 47 は本願配列番号 13 に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

よって、当該文献 6 に記載された発明は請求の範囲 1-6, 8 に係る発明と区別することができない。

請求の範囲 7

文献 5 には蛋白質 NO: 47 と相互作用する化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲 7 に係る発明は当業者が文献 6 に記載された発明から容易に想到しうるものである。

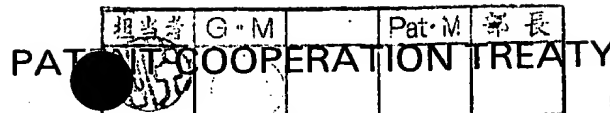
THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 VI 欄の続き

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 00/06698, A1 「E, X」	10.02.00	29.07.99	30.07.98
WO, 99/31117, A1 「E, X」	24.06.99	17.12.98	18.12.97
WO, 99/46289, A1 「E, X」	03.09.99	11.03.99	12.03.98

THIS PAGE BLANK (11/15/70)



8

From the INTERNATIONAL BUREAU

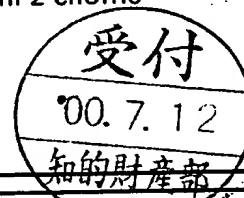
PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 22 June 2000 (22.06.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2609WOOP	International application No. PCT/JP00/03221

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (for all designated States except US)
ITOH, Yasuaki et al (for US)

International filing date : 19 May 2000 (19.05.00)
Priority date(s) claimed : 20 May 1999 (20.05.99)
Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 05 June 2000 (05.06.00)
List of designated Offices :

AP : GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW

EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM

EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE

OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG

National : AE,AG,AL,AM,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CN,CR,CU,CZ,DM,DZ,EE,GD,GE,HR,HU,ID,
IL,IN,IS,JP,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MX,MZ,NO,NZ,PL,RO,RU,SG,SI,SK,
TJ,TM,TR,TT,UA,US,UZ,VN,YU,ZA

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☒ confirmation of precautionary designations
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Masashi HONDA
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

日本国
Fax 6/1

出願者	G・M	Pat・M	部長
特許協力条約			

特許局	2001.7月17日
-----	------------

3

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

高橋 秀一

あて名

〒532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

殿

P C T

国際出願番号及び 国際出願日の通知書

（法施行規則第22条、第23条）
〔PCT規則20.5(c)〕

受付

00.6.-1

知的財産部

PCT/JP00/03221

RO105

発送日（日.月.年）

30.05.00

出願人又は代理人
の書類記号

2609WOOP

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP00/03221

国際出願日（日.月.年）

19.05.00

優先日（日.月.年）

20.05.99

出願人（氏名又は名称）

武田薬品工業株式会社

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、30日05月00年に国際事務局に送付した。

注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特許庁長官

THIS PAGE BLANK (U8PT0)

担当者	G・M	Pat・M	部長



発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社 知的財産部

-0.11.12 PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨
の決定の送付の通知書

（法施行規則第41条）
〔PCT規則44.1〕

発送日
（日・月・年） 12.09.00

出願人又は代理人
の書類記号

2609WOOP

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/JPO0/03221

国際出願日
（日・月・年）

19.05.00

出願人（氏名又は名称）

武田薬品工業株式会社

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる（PCT規則46参照）。

いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。

どこへ 直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22)740.14.35

詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項（PCT17条(2)(a)）の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

3. ☐ 法施行規則第44条（PCT規則40.2）に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。

☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。

☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。

優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から30月まで（官庁によってはもっと遅く）国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特許庁長官

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。
3. 文献の写しの請求について

国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル
財団法人 日本特許情報機構 サービス課
TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手續においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手續において請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手續においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合については、以下を参照すること。

どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直さなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

補正書にどのような書類を添付しなければならないか

書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。

THIS PAGE BLANK (U8PT0)

次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならない、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならない、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/ISA/401)の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。


指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	
国際出願日	
(受付印)	

出願人又は代理人の書類記号
(希望する場合、最大12字)

2609WO0P

第 I 欄 発明の名称

新規ポリペプチド

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

武田薬品工業株式会社
TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
〒541-0045 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,
OSAKA 541-0045 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国について出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

伊藤康明 ITOH Yasuaki
〒300-0832 日本国茨城県土浦市桜ヶ丘町36番地16
36-16, Sakuragaoka-machi, Tsuchiura-shi, IBARAKI 300-0832 JAPAN

この欄に記載した者は、
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国について出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続葉に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

11404 弁理士 高橋秀一 TAKAHASHI Shuichi
〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内
c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,
OSAKA 532-0024 JAPAN

電話番号:

03-3278-2235

ファクシミリ番号:

03-3278-2222

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続葉を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

茂木伸一 MOGI Shinichi
〒302-0121 日本国茨城県北相馬郡守谷町みずき野 1丁目 17番地 16
17-16, Mizukino 1-chome, Moriya-machi, Kitasoma-gun, IBARAKI 302-0121
JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

田中秀幸 TANAKA Hideyuki
〒305-0821 日本国茨城県つくば市春日 1丁目 7番地 9-1302号
7-9-1302, Kasuga 1-chome, Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0821 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

大久保尚一 OHKUBO Shoichi
〒300-1234 日本国茨城県牛久市中央 1丁目 4番地 23
4-23, Chuo 1-chome, Usiku-shi, IBARAKI 300-1234 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

大儀和宏 OGI Kazuhiro
〒305-0045 日本国茨城県つくば市梅園 2丁目 16番地 1-206号
16-1-206, Umezono 2-chome, Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0045 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☐ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅴ欄 国の指定

規則 4. 9(a)の規定に基づき次の指定を行う (該 ☐ 口にレ印を付すこと; 少なくとも1つの口にレ印 ☐ すること)。

広域特許

- ☒ **AP** **ARIPO特許** : GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SL シエラ・レオネ Sierra Leone, SZ スワジランド Swaziland, TZ タンザニア United Republic of Tanzania, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **EA** **ユーラシア特許** : AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **EP** **ヨーロッパ特許** : AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **OA** **OAPI特許** : BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, GW ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャド Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締約国である他の国 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

- | | |
|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE アラブ首長国連邦 United Arab Emirates | <input type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg |
| <input type="checkbox"/> AL アルバニア Albania | <input checked="" type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia |
| <input type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> MA モロッコ Morocco |
| <input type="checkbox"/> AT オーストリア Austria | <input checked="" type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia | <input checked="" type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados | <input type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria | <input type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> NO ノールウェー Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> NZ ニュー・ジールランド New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada | <input checked="" type="checkbox"/> PL ポーランド Poland |
| <input type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN 中国 China | <input checked="" type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR コスタリカ Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU キューバ Cuba | <input type="checkbox"/> SD スーダン Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic | <input type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden |
| <input type="checkbox"/> DE ドイツ Germany | <input checked="" type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore |
| <input type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia |
| <input type="checkbox"/> DM ドミニカ Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE エストニア Estonia | <input type="checkbox"/> SL シエラ・レオネ Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> ES スペイン Spain | <input checked="" type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> FI フィンランド Finland | <input checked="" type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> TR トルコ Turkey |
| <input type="checkbox"/> GD グレナダ Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE グルジア Georgia | <input type="checkbox"/> TZ タンザニア United Republic of Tanzania |
| <input type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine |
| <input type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia | <input type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL イスラエル Israel | <input checked="" type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN インド India | <input checked="" type="checkbox"/> ZA 南アフリカ共和国 South Africa |
| <input type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland | <input type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP 日本 Japan | |
| <input type="checkbox"/> KE ケニア Kenya | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan | |
| <input type="checkbox"/> KP 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR リベリア Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS レソト Lesotho | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania | |

以下の口は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定 (国内特許のために) するためのものである

- ☒ **DZ** アルジェリア Democratic People's Republic of Algeria
- ☒ **AG** アンティグア・バーブダ Antigua and Barbuda
- ☒ **MZ** モザンビーク Mozambique

確認の指定の宣言: 出願人は、上記の指定に加えて、規則 4. 9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。 (指定の確認(料金を含む)は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

追記欄 この追記欄を使用しないときは、この欄を願書に含めないこと。

1. 全ての情報を該当する欄の中に記載できないとき。

この場合は、「第何欄.....の続き」(欄番号を表示する) と表示し、記載できない欄の指示と同じ方法で情報を記載する。； 特に、

(i) 出願人又は発明者として3人以上いる場合で、「続葉」を使用できないとき。

この場合は、「第Ⅲ欄の続き」と表示し、第Ⅲ欄で求められている同じ情報を、それぞれの者について記載する。

(ii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、「追記欄に記載した指定国」にレ印を付しいるとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する出願人の氏名(名称)を表示し、それぞれの氏名(名称)の次にその者が出願人となる指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、発明者又は発明者及び出願人である者が、すべての指定国のための又は米国のための発明者ではないとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する発明者の氏名を表示し、その者が発明者である指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iv) 第Ⅳ欄に示す代理人以外に代理人がいるとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」と表示し、第Ⅳ欄で求められている同じ情報を、それぞれの代理人について記載する。

(v) 第Ⅴ欄において指定国又はOAPI特許が、「追加特許」又は「追加証」を伴うとき、又は、米国が「継続」又は「一部継続」を伴うとき。

この場合は、「第Ⅴ欄の続き」及び該当するそれぞれの指定国又はOAPI特許を表示し、それぞれの指定国又はOAPI特許の後に、原特許又は原出願の番号及び特許付与日又は原出願日を記載する。

(vi) 第Ⅵ欄において優先権を主張する先の出願が4件以上あるとき。

この場合は、「第Ⅵ欄の続き」と表示し、第Ⅵ欄で求められている同じ情報を、それぞれの先の出願について記載する。

(vii) 第Ⅶ欄において先の出願がARIPOの特許出願であるとき。

この場合は、「第Ⅶ欄の続き」と表示し、その先の出願に対応する項目の番号を特定して、更に、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を表示する。

2. 出願人が、第Ⅴ欄における確認の指定の宣言に関し、その宣言からいずれかの国を除くことを希望するとき。

この場合は、「確認の指定の宣言から、以下の指定国を除く」と記載し、除かれる国名又は2文字の国コードを表示する。

3. 出願人が、指定官庁について不利にならない開示又は新規性の喪失についての例外に関する国内法の適用を請求するとき。

この場合は、「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述」と表示し、以下にその内容を記述する。

「第Ⅳ欄の続き」

11045 弁理士 内山 務 UCHIYAMA Tsutomu

〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,

OSAKA 532-0024 JAPAN

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第VI欄 優先権主張

☐ 他の優先権の主張(先の出願)が追記欄に記載されている

先の出願日 (日. 月. 年)	先の出願番号	先の		
		国内出願 : 国 名	広域出願 : *広域官庁名	国際出願 : 受理官庁名
(1) 20. 05. 99	平成11年特許願 第140229号	日本国 Japan		
(2)				
(3)				

☒ 上記 () の番号の先の出願(ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る) のうち、次の () の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁 (日本特許庁の長官) に対して請求している。 (1)

*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない(規則4.10(b)(ii))。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関 (ISA) の選択

ISA/JP

先の調査結果の利用請求; 当該調査の照会
(先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合)

出願日 (日. 月. 年)

出願番号

国名 (又は広域官庁)

第VIII欄 照合欄 ; 出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 5 枚
明細書 (配列表を除く) 77 枚
請求の範囲 1 枚
要約書 1 枚
図面 1 枚
明細書の配列表 35 枚
合計 120 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- | | |
|--|--|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙 | 5. <input type="checkbox"/> 優先権書類 (上記第VI欄の () の番号を記載する): |
| <input type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 | 6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文 (翻訳に使用した言語名を記載する): |
| <input type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面 | 7. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面 |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 | 8. <input checked="" type="checkbox"/> ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列表 (フレキシブルディスク) |
| 3. <input checked="" type="checkbox"/> 包括委任状の写し | 9. <input checked="" type="checkbox"/> その他 (書類名を詳細に記載する)
: 陳述書、フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面 |
| 4. <input type="checkbox"/> 記名押印 (署名) の説明書 | |

要約書とともに提示する 図面:

本国際出願の使用言語名:

日本語

第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

高橋 秀一



内山 務



1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日		2. 図面	
3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって その後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日)		<input type="checkbox"/> 受理された	
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日		<input type="checkbox"/> 不足図面がある	
5. 出願人により特定された 国際調査機関	ISA / JP	6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に 調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

様式 PCT/RO/101 (最終用紙) (1998年7月:再版2000年1月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

P C

受 官庁記入欄

手 数 料 計 算 用 紙

願 書 附 属 書

国際出願番号

出願人又は代理人の書類記号

2609WO0P

受理官庁の日付印

出願人

武田薬品工業株式会社

所定の手数料の計算

1. 及び2. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）
第18条第1項第1号の規定による手数料（注1）
（送付手数料 [T] 及び調査手数料 [S] の合計）

95,000 円 T+S

2. 国際手数料（注2）

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 120 枚

最初の30枚まで

46,000 円 b1

90 × 1,100 =

30枚を越える用紙の枚数 用紙1枚の手数料

99,000 円 b2

b1及びb2に記入した金額を加算し、合計額をBに記入

145,000 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定数（注3） 65

8 × 9,900 =

支払うべき指定手数料
の数（上限は8）
（注4）

1指定当たりの手数料
（円）

79,200 円 D

B及びDに記入した金額を加算し、合計額をIに記入

224,200 円 I

4. 納付すべき手数料の合計

T+S及びIに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

299,400 円

合 計

（注1）送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許印紙をもって納付しなければならない。

（注2）国際手数料については、受理官庁である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込を証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

（注3）願書第V欄でレ印を付した □ の数。

（注4）指定数を記入する。ただし、8指定以上は一律8とする。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 09 FEB 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 2609WOOP	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/03221	国際出願日 (日.月.年) 19.05.00	優先日 (日.月.年) 20.05.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ⁷ C07K14/47, C12P21/02, C07K16/18, C12P21/08, G01N33/50, G01N33/15, G01N33/563, A61K38/16, A61K39/395		
出願人 (氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 9 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☒ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☒ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 06.07.00	国際予備審査報告を作成した日 25.01.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上 條 肇	4B 9453
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☐ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. ☒ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

特許請求の範囲第1項に記載の配列番号1ないし15から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドに共通の事項は「分泌性ポリペプチド」である。

PCT規則13.3によると、発明の単一性の判断はこれらの発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われるべきものである。

ここで、分泌性ポリペプチドは本出願前周知であると認められるから、当該共通事項は先行技術の域を出るものではなく、PCT規則13.2における特別な技術的事項であるとはいえず、請求の範囲1に記載された発明のうち配列番号1～15に係るものは単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえないので、15個の発明からなる発明群であると認める。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- ☒ すべての部分
- ☐ 請求の範囲 _____ に関する部分

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	7	有
	請求の範囲	1-6, 8	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-8	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1-3

文献1 (JP, 10-70986, A) には請求項1及び配列番号6としてヒトTh1蛋白質が記載されている。当該蛋白質のアミノ酸配列は本願配列番号3に示されるアミノ酸配列と配列中の1-223番目のアミノ酸番号において99%以上の同一性を有するので、本願配列番号3に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなる蛋白質であるといえる。

また、文献1の請求項6-11及び明細書12-14ページには形質転換体を用いたヒトTh1蛋白質の製造法や当該蛋白質に対する抗体が開示されている。

よって、当該文献1に記載された発明は請求の範囲1-3に係る発明と区別することができない。

請求の範囲 4-8

文献1にはヒトTh1蛋白質と相互作用する化合物のスクリーニングやスクリーニングによって得られた化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲4-8に係る発明は当業者が文献1に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲 1-6, 8

文献2 (WO, 98/54963, A2) にはヒト由来のNO:115 (HDTAW95) と名付けられた蛋白質が配列番号125として開示されており (第90-91ページ、Table 1)、また開示された蛋白質あるいはそれをコードするDNAを用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、スクリーニング方法、医薬品への適用方法が記載されている。

文献1において、配列番号125として開示された全長1288残基の核酸配列のうち残基番号130から851の核酸配列は、本願配列番号:15に記載の蛋白質をコードする核酸配列と90%以上一致する。

よって、文献2に記載の蛋白質NO:115は本願配列番号7に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 00/05367, A2 「E, X」	03.02.00	22.07.99	24.07.98
WO, 99/24836, A1 「E, X」	20.05.99	04.11.98	07.11.97
WO, 99/31131, A2 「E, X」	24.06.99	18.12.98	18.12.97
WO, 99/67385, A1 「E, X」	29.12.99	22.06.99	23.06.98
WO, 99/63088, A2 「E, X」	09.12.99	02.06.99	02.06.98
WO, 99/57144, A2 「E, X」	11.11.99	04.05.99	05.05.98
US, 5958726, A 「E, X」	28.09.99	02.06.97	

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 VI 欄の続き

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 00/06698, A1 「E, X」	10.02.00	29.07.99	30.07.98
WO, 99/31117, A1 「E, X」	24.06.99	17.12.98	18.12.97
WO, 99/46289, A1 「E, X」	03.09.99	11.03.99	12.03.98

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

本願発明に係るポリペプチドについては生体内で液性因子として存在するため、本発明のポリペプチドなどまたは本発明のDNAなどに異常があったり、欠損している場合あるいは発現量が異常に減少または高進している場合、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化器疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの治療・予防剤などの医薬品として使用することができる旨記載されている。

しかしながら、本願発明に係るどのポリペプチドが具体的にどのような疾患に関与しているかについては本願明細書に何ら開示されておらず、また当業者にとってその関係は自明であるとはいえない。よって当業者といえども本願発明に係るポリペプチドを具体的な医薬品として用いることは出来ない。

したがって、請求の範囲 7-8 に係る発明について本願明細書には十分に裏付けがない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

よって、当該文献2に記載された発明は請求の範囲1～6, 8に係る発明と区別することができない。

請求の範囲7

文献2には蛋白質NO: 115と相互作用する化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲7に係る発明は当業者が文献2に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲1-3

文献3 (WO, 98/08870, A1) にはヒト由来のサイトカインであるインターロイキン19が配列番号1及び2として開示されており、また開示されたインターロイキン19あるいはそれをコードするDNAを用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、医薬品への適用方法が記載されている。

文献3において、配列番号2として開示された全長177残基のアミノ酸配列のうち残基番号-24から80のアミノ酸配列は、本願配列番号: 8に記載の蛋白質をコードするアミノ酸配列の残基番号1から104と完全に一致する。

よって、文献3に記載のインターロイキン19は本願配列番号8に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

よって、当該文献3に記載された発明は請求の範囲1～3に係る発明と区別することができない。

請求の範囲4-8

文献3にはインターロイキン19と相互作用する化合物を医薬品として利用することやスクリーニングを行うことは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲4-8に係る発明は当業者が文献3に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲1-6, 8

文献4 (WO, 98/39948, A2) にはヒト由来のNO: 165 (HEAAL31) と名付けられた蛋白質が配列番号477として開示されており (第104～105ページ、Table 1)、また開示された蛋白質あるいはそれをコードするDNAを用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、スクリーニング方法、医薬品への適用方法が記載されている。

文献4において、配列番号477として開示された全長177残基のアミノ酸配列のうち残基番号1から104のアミノ酸配列は、本願配列番号: 8に記載の蛋白質をコードするアミノ酸配列の残基番号1から104と完全に一致する。

よって、文献4に記載のNO: 165は本願配列番号8に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

よって、当該文献4に記載された発明は請求の範囲1-6, 8に係る発明と区別することができない。

請求の範囲7

文献4には蛋白質NO: 165と相互作用する化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニング

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

を行うことは常套手段であるから、請求の範囲 7 に係る発明は当業者が文献 4 に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲 1-6, 8

文献 5 (WO, 99/22243, A1) にはヒト由来の NO: 116 (HKACD58) と名付けられた蛋白質が配列番号 126, 275 として開示されており (第 171~173 ページ、Table 1)、また開示された蛋白質あるいはそれをコードする DNA を用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、スクリーニング方法、医薬品への適用方法が記載されている。

文献 5 において、配列番号 275 として開示された全長 155 残基のアミノ酸配列のうち残基番号 1 から 155 のアミノ酸配列は、本願配列番号: 12 に記載の蛋白質をコードするアミノ酸配列の残基番号 1 から 155 と完全に一致する。

よって、文献 5 に記載の NO: 165 は本願配列番号 12 に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

よって、当該文献 5 に記載された発明は請求の範囲 1-6, 8 に係る発明と区別することができない。

請求の範囲 7

文献 5 には蛋白質 NO: 165 と相互作用する化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲 7 に係る発明は当業者が文献 5 に記載された発明から容易に想到しうるものである。

請求の範囲 1-6, 8

文献 6 (WO, 98/42738, A1) にはヒト由来の NO: 47 (HKACD58) と名付けられた蛋白質が配列番号 57, 171 として開示されており (第 44 ページ、Table 1)、また開示された蛋白質あるいはそれをコードする DNA を用いたベクター、形質転換細胞、蛋白質製造方法、抗体、スクリーニング方法、医薬品への適用方法が記載されている。

文献 6 において、配列番号 171 として開示された全長 69 残基のアミノ酸配列のうち残基番号 1 から 69 のアミノ酸配列は、アミノ酸を Xaa として開示されていない 5 残基を除き、本願配列番号: 13 に記載の蛋白質をコードするアミノ酸配列の全体と完全に一致する。

よって、文献 6 に記載の NO: 47 は本願配列番号 13 に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であるといえる。

よって、当該文献 6 に記載された発明は請求の範囲 1-6, 8 に係る発明と区別することができない。

請求の範囲 7

文献 5 には蛋白質 NO: 47 と相互作用する化合物を医薬品として利用することは記載されていないものの、ヒト由来の蛋白質をもとにして医薬品のスクリーニングを行うことは常套手段であるから、請求の範囲 7 に係る発明は当業者が文献 6 に記載された発明から容易に想到しうるものである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 30 November 2000 (30.11.00)		IMPORTANT INFORMATION	
Applicant's or agent's file reference 2609WOOP			
International application No. PCT/JP00/03221	International filing date (day/month/year) 19 May 2000 (19.05.00)	Priority date (day/month/year) 20 May 1999 (20.05.99)	
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al			

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AG, AU, BG, CA, CN, CZ, DZ, IL, JP, KR, MN, MZ, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AL, AM, AZ, BA, BB, BR, BY, CR, CU, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IN, IS, KG, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MX, SG, SI, TJ, TM, TR, TT, UA, UZ, VN, YU, ZA

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

担当者	G・M	Pat・M	部 課
印 章	PATENT COOPERATION TREATY		

PCT/JP00/03221

16

PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi
 Osaka Plant of Takeda Chemical
 Industries, Ltd.
 17-85, Jusohonmachi 2-chome
 Yodogawa-ku
 Osaka-shi
 Osaka 532-0024
 JAPON



Date of mailing (day/month/year) 12 July 2001 (12.07.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2609WO0P	
International application No. PCT/JP00/03221	International filing date (day/month/year) 19 May 2000 (19.05.00)
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP, AU, CA, CN, CZ, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP, EA, AE, AG, AL, AM, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CR, CU, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, MZ, SG, SI, TJ, TM, TR, TT, UA, UZ, VN, YU, ZA, OA

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Eliott Peretti Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

Date of mailing (day/month/year)
30 November 2000 (30.11.00)

Applicant's or agent's file reference
2609WOOP

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/JP00/03221

International filing date (day/month/year)
19 May 2000 (19.05.00)

Priority date (day/month/year)
20 May 1999 (20.05.99)

Applicant
TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AG,AU,DZ,KR,MZ,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE,AL,AM,AP,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CN,CR,CU,CZ,DM,EA,EE,EP,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,IS,
JP,KG,KZ,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,OA,PL,RO,RU,SG,SI,SK,TJ,TM,TR,TT,
UA,UZ,VN,YU,ZA
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
30 November 2000 (30.11.00) under No. WO 00/71581

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des C. lombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000年11月30日 (30.11.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/71581 A1

(51) 国際特許分類: C07K 14/47, C12P 21/02,
C07K 16/18, C12P 21/08, G01N 33/50, 33/15, 33/563,
A61K 38/16, 39/395 // C12N 15/12

LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町
四丁目1番1号 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03221

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2000年5月19日 (19.05.2000)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 伊藤康明 (ITO, Yasuaki) [JP/JP]; 〒300-0832 茨城県土浦市桜ヶ丘町36
番地16 Ibaraki (JP). 茂木伸一 (MOGI, Shinichi) [JP/JP];
〒302-0121 茨城県北相馬郡守谷町みずき野1丁目
17番地16 Ibaraki (JP). 田中秀幸 (TANAKA, Hideyuki)
[JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地
9-1302号 Ibaraki (JP). 大久保尚一 (OHKUBO, Shoichi)
[JP/JP]; 〒300-1234 茨城県牛久市中央1丁目4番地23
Ibaraki (JP). 大儀和宏 (OGI, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒305-
0045 茨城県つくば市梅園2丁目16番地1-206号 Ibaraki
(JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/140229 1999年5月20日 (20.05.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDE

(54) 発明の名称: 新規ポリペプチド

(57) Abstract: A novel secretory protein or its salt; a process for producing this protein; drugs containing this protein; an antibody against this protein; a method/kit for screening a compound or its salt which promotes or inhibits the activity of the above protein, and the like. The above protein is usable in remedies and preventives for various diseases such as cancer, immune diseases, lung function disorder, liver function disorder, infectious diseases and gastrointestinal disorder. The above antibody is usable in quantitating the above protein in test samples, etc. Further, the above protein is useful as a reagent for screening a compound which promotes or inhibits the activity of this protein.

(57) 要約:

本発明は、分泌性新規タンパク質またはその塩、該タンパク質の製造法、該タンパク質を含有してなる医薬、該タンパク質に対する抗体、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法/スクリーニング用キットなどに関する。

本発明のタンパク質は、例えば、癌、免疫疾患、肺機能障害、肝臓機能障害、感染症または胃腸障害などの種々の疾病の治療・予防剤として使用することができる。また、本発明の抗体は、被検液中の本発明のタンパク質の定量などに使用することができる。さらに、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングするための試薬として有用である。

WO 00/71581 A1



(74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).

AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

新規ポリペプチド

5 技術分野

本発明は新規な分泌性ポリペプチド、分泌性ポリペプチドの新規用途などに関する。

背景技術

- 10 生体は、細胞間、または組織間で互いに情報伝達をすることにより、発生、分化、成長、修復、恒常性の維持などの統合の取れた調節を行っているが、多くの場合、細胞外に分泌されるタンパク性因子が情報伝達物質として重要な役割を果たしている。例えば、サイトカインと呼ばれる一連の分泌性因子（液性因子）は、物質的には分子量2万～5万程度のしばしば糖鎖修飾を受けたポリ
- 15 ペプチドで、主として免疫系、造血系に作用するホルモン様分子である。これまで、単球系細胞から放出されるマクロファージ活性化因子や遊走阻止因子として見いだされた各種モノカインや、種々の細胞を活性化して抗ウイルス作用を発揮させるインターフェロン α 、 β 、 γ 、またT細胞から産生されリンパ球増殖分化因子と考えられてきた各種リンホカインと呼ばれるポリペプチド群も、
- 20 その後相次いで多彩な生物活性が報告され、総称的にサイトカインの範疇に含まれて呼ばれることが多い。サイトカインの作用の特徴として、オートクラインかパラクラインとしての活性が優位であることが挙げられる。一方、内分泌組織から生産されるペプチドホルモンや増殖因子などの液性因子は、エンドクライン的な活性を示し、これら液性因子の多くについて疾病との関連性を探る
- 25 研究や医薬としての可能性を追求する開発研究が盛んに行われている。

ところで、こうした生体にとって重要なタンパク性因子は、これまでその多くが固有の生物活性を指標にして発見されたり、既存の生理活性ポリペプチドとの構造上の類似性を手がかりにして発見されてきたものである。しかし、哺

乳動物などの高等生物で見られる生体の恒常性の巧妙な維持を考えた場合、こうした公知の生理活性ポリペプチドやペプチド以外にも多くの未知の因子が存在し、重要な機能を担っていることが十分予想される。近年、ヒトをはじめ各種生物の cDNA ライブラリーの大規模塩基配列決定やゲノム構造解析プロジェクトにより膨大な数の新規遺伝子候補が挙がってきており、コンピュータによる情報処理解析技術を駆使してそれらの遺伝子産物の機能を予測し、生物学、医学、獣医学、農学などに応用しようとする試みが行われつつある〔トレンドイン バイオテクノロジー (Trends in Biotechnology), 14 巻, 294 (1996 年)]。しかし一般にそうした配列情報は断片的で不正確なものが多く、これらの中から直接的に全く新しい有用な新規遺伝子を選択することは容易でないのが現状である。例えば、大規模塩基配列決定で得られた配列情報の中には部分的な読み間違いが多々あり、正しいオープンリーディングフレーム (ORF) やアミノ酸配列を正確に知るには、間違いのない塩基配列を情報源とし、かつ分泌性因子 (液性因子) として期待できるかどうか、適性に判断する必要があった。本発明は、そのような観点から大規模 cDNA 配列解析と、その後の詳細な情報分析から新規な液性因子を見出したものである。

本発明は新規な液性因子を見出すことで、生物学、医学、薬学、獣医学などに利用可能な新規ポリペプチド、その部分ペプチド、またはそれらの塩、組換えベクター、形質転換体、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチド、部分ペプチドを含有する医薬、および該ポリペプチドなどに対する抗体などを提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために誠意研究を重ねた結果、大規模 cDNA 塩基配列データベースから、新規分泌性ポリペプチドをコードする cDNA を探索し、本目的に合致した新規分泌性ポリペプチドの構造を複数つきとめた。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる少なくとも一つ（好ましくは、一つ）のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドまたはその塩、

5 (2) 上記(1)記載のポリペプチドをコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ポリペプチドを生成せしめることを特徴とする上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩の製造法、

(3) 上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩に対する抗体、

(4) 上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする

10 上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(5) 上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩を含有してなる上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

15 (6) 上記(4)記載のスクリーニング方法または上記(5)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

(7) 上記(4)記載のスクリーニング方法または上記(5)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩
20 の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、および

(8) 上記(1)記載のポリペプチドまたはその塩を含有してなる医薬などに関する。

さらには、本発明は、

(9) 配列番号：1ないし配列番号：15で表わされるアミノ酸配列から選ば
25 れる一つのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：1ないし配列番号：15で表わされるアミノ酸配列から選ばれる一つのアミノ酸配列と約50%以上（好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは

約95%以上)の相同性を有するアミノ酸配列である上記(1))記載のポリペプチド、

- (10) 配列番号: 1ないし配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列から選ばれる一つのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号: 1ないし配列番号: 15から選ばれる一つのアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号: 1ないし配列番号: 15から選ばれる一つのアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号: 1ないし配列番号: 15から選ばれる一つのアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列である上記(1)記載のポリペプチド、

(11) 上記(1)記載のポリペプチドをコードするDNA、および

- (12) 上記(1)記載のポリペプチドをコードするDNAを含有する組換えベクターなどを提供する。

さらに本発明のポリペプチドは、分子量マーカー、組織マーカー、染色体マッピング、遺伝病の同定、プライマー、プローブの設計などの基礎研究にも利用できる。

20 図面の簡単な説明

図1は実施例16-20で行われた各クローンの動物細胞における分泌確認の結果を示すウエスタンブロット解析図である。6-well plate から回収した培養上清 1/16 well 相当を 10 - 25% SDS-PAGE で展開し、抗 FLAG 抗体を用いて Western Blot 解析を行なった。

- 25 図中、レーン 1 は TGC-480 を、レーン 2 は TGC-711 を、レーン 3 は TGC-714 を、レーン 4 は TGC-715 を、レーン 5 は TGC-623 をそれぞれ発現した COS7 細胞の培養上清を電気泳動したことを示す。

発明の実施をするための最良の形態

本発明の配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸配列を含有するポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと称することがある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニ
5 ワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑
10 膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、
15 筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、唾液腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、軟骨、関節、骨格筋などに由来するポリペプチドであってもよく、組換えポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。

また、本発明のポリペプチドはシグナルペプチドを有しているので、ポリペ
20 プチドを効率よく細胞外に分泌させることができる。

配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる一つのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1ないし配列番号：15から選
ばれる一つのアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに
好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約9
25 0%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが
挙げられる。

本発明の配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる一つのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドとしては、例えば、前

記の配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる一つのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる一つのアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質の性質を有するポリペプチドなどが好ましい。

- 5 実質的に同質の性質としては、例えば、分泌され液性因子として作用することなどが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が定性的に同質であることを示す。したがって、分泌作用や溶解度などの性質が同等（例、約0.1～100倍、好ましくは約0.5～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの性質の程度、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

- 10 具体的には、配列番号：1の第22番目のアミノ酸ないし125番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：2の第24番目のアミノ酸ないし121番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：3の第20番目のアミノ酸ないし223番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：4の第22番目のアミノ酸ないし248番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：5の第20番目のアミノ酸ないし173番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：6の第21番目のアミノ酸ないし261番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：7の第31番目のアミノ酸ないし243番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：8の第19番目のアミノ酸ないし149番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：9の第21番目のアミノ酸ないし136番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：10の第23番目のアミノ酸ないし123番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：11の第21番目のアミノ酸ないし163番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：12の第19番目のアミノ酸ないし301番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：13の第27番目のアミノ酸ないし

し69番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：14の第24番目のアミノ酸ないし69番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：15の第27番目のアミノ酸ないし197番のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどが挙げられる。

- 5 また、本発明のポリペプチドとしてより具体的には、例えば、配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる一つのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる一つのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる一つのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる一つのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどのいわゆるムテインも含まれる。

- 15 上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

- 20 本明細書におけるポリペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをはじめとする、本発明のポリペプチドは、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

25 ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シク

ロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のポリペプチドには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパクなどの複合タンパクなども含まれる。

本発明のポリペプチドまたはその塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のポリペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養す

ることによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせてることにより精製単離することができる。

本発明のポリペプチドまたはその塩、またはそのアミド体もしくはその塩の合成には、通常市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM 樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmoc アミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げる
10
15
20
25
ことができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結形成成反応を実施し、目的のポリペプチドまたはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBt エステルあるいはHOOBt エステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド

- 縮合反応に使用しうるということが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド, N, N-ジメチルアセトアミド, N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。
- 10 活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反
- 15 応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

20

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

25

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級 (C_{1-6}) アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、 Cl_2 -Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、*t*-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、*N*-ヒドロキシスクシミド、*N*-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 -20°C ～ 40°C の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により

除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

- 5 原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

- ポリペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドのアミド体を得ることができる。

- ポリペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

- 本発明のポリペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の1～5に記載された方法が挙げられる。

1. M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)

2. Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)

5 3. 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)

4. 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 IV、205、(1977 年)

5. 矢島治明監修、続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、広川書店

10 また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

15 本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、前述した本発明のポリペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノム DNA、前記した細胞・組織由来の cDNA、合成 DNA のいずれでもよい。

20 ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR 法と略称する) によって増幅することもできる。

25 本発明のポリペプチドをコードする DNA としては、例えば、配列番号：16 ないし配列番号：30 から選ばれる少なくとも一つの塩基配列を含有する DNA、または配列番号：16 ないし配列番号：30 から選ばれる少なくとも一つの塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質 (例、免疫原性などを有

するポリペプチドをコードするDNAなどを有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質を有するポリペプチドをコードするDNAであれば何れのものでもよい。

より具体的には、配列番号：16ないし配列番号：30から選ばれる少なくとも一つの塩基配列を含有するDNA、または配列番号：16ないし配列番号：30から選ばれる少なくとも一つの塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質（例、免疫原性など）を有するポリペプチドをコードするDNAなどを有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質を有するポリペプチドをコードするDNAなどがあげられ、さらに具体的には、配列番号：16ないし配列番号：30から選ばれる少なくとも一つの塩基配列を含有するDNA、または配列番号：16ないし配列番号：30から選ばれる少なくとも一つの塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質（例、分泌作用など）を有するポリペプチドをコードするDNAなどを有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の性質を有するポリペプチドをコードするDNAなどがあげられる。

配列番号：16ないし配列番号：30から選ばれる少なくとも一つの塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：16ないし配列番号：30から選ばれる少なくとも一つの塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

さらに具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：16で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：17で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：18で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコー

ドするDNAとしては、配列番号：19で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：20で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：6で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：21で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：22で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：8で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：23で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：24で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：25で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：26で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：27で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：13で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：28で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：29で表される塩基配列を含有するDNAが、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：30で表される塩基配列を含有するDNAがあげられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリ

ンジエントな条件に従って行なうことができる。

ハイスロインジエントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20 mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。

- 5 本発明のポリペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーとそのポリペプチドが発現している組織や細胞由来の鋳型を用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペ
- 10 いて標識したものをそのポリペプチドが発現している組織や細胞由来のライブラリーに対するハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを
- 15 使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan™-G (宝酒造 (株))、Mutan™-K (宝酒造 (株)) などを用いて、Gapped duplex 法や Kunkel 法などの自公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

- 20 クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な
- 25 合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製

造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、
5 λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞
10 を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、
15 trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGK
20 プロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いること
25 ができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイ

シン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G 4 1 8耐性）等が挙げられる。特に、dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いて dhfr 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

- 5 また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、Pho A・シグナル配列、Omp A・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC 2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

- 15 宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

- エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K 1 2・DH 1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] など
- 20 が用いられる。
- 25

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1

984))などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来のHigh Five™細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。〕

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO(dhfr-)細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 11

1 (1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユー
5 エスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

10 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456 (1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、ポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

15 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、
20 ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザ
25 ミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせ

るために、例えば、 3β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 $15\sim43^{\circ}\text{C}$ で約 $3\sim24$ 時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

- 5 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 $30\sim40^{\circ}\text{C}$ で約 $6\sim24$ 時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユー
10 エスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や 0.5% カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユー
15 エスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約 $5\sim8$ に調整するのが好ましい。培養は通常約 $20^{\circ}\text{C}\sim35^{\circ}\text{C}$ で約 $24\sim72$ 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。
20 培地のpHは約 $6.2\sim6.4$ に調整するのが好ましい。培養は通常約 27°C で約 $3\sim5$ 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 $5\sim20\%$ の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 39
25 6(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding

of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950))などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

5 以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のポリペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、
10 超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あ
15 るいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリル
20 ルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

25 かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のポリペプチドまたはその塩の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイや Western blotting などにより測定することができる。

本発明のポリペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のポリペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のポリペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のポリペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

15 〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のポリペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の

標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髄腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1 : 1 ~ 20 : 1程度であり、PEG (好ましくはPEG 1000 ~ PEG 6000) が10 ~ 80 %程度の濃度で添加され、20 ~ 40℃、好ましくは30 ~ 37℃で1 ~ 10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1 ~ 20 %、好ましくは10 ~ 20 %の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1 ~ 10 %の牛胎児血清を含むGIT培地 (和光純薬工業

(株))あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日水製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例、DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原(ポリペプチド抗原)自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のポリペプチドまたはそれらの塩に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、

チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

- 縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

- 抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

また、本発明のポリペプチドを用いて、Nat Biotechnol, 14, 845-851. (1996)、Nat Genet 15, 146-156. (1997)、PNAS, 97(2), 722-727. (2000)等に記載の方法に準じてヒト化抗体を作製することも可能である。

- 本発明のポリペプチドをコードするDNA（以下、アンチセンスDNAの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

- 本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のポリペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチ

センスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

本発明のポリペプチドは、シグナルペプチドを有するため、細胞外に効率よく分泌され、液性因子として、シグナル伝達や自己防衛などのための重要な生物活性を有する。

以下に、本発明のポリペプチドまたはその塩（以下、本発明のポリペプチド等と略記する場合がある）、本発明のポリペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のポリペプチドまたはそれらの塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、およびアンチセンスDNAの用途を説明する。

（１）本発明のポリペプチドは、組織特異的に発現しているため、組織マーカーとして使用することができる。すなわち組織の分化、病態、癌の転移などの検出のためのマーカーとして有用である。また、対応するレセプター、リガンド、結合タンパクなどの分取にも利用できる。さらに、自体公知のハイスループットスクリーニングのためのパネルにして、生物活性を調べるのに利用できる。また、染色体マッピングを行い、遺伝病の研究にも利用できる。

（２）本発明のポリペプチドが関与する各種疾病の治療・予防剤

本発明のポリペプチドなどは、生体内で液性因子として存在するため、本発明のポリペプチドなどまたは本発明のDNAなどに異常があったり、欠損している場合あるいは発現量が異常に減少または高進している場合、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの種々の疾病が発症する。

したがって、本発明のポリペプチド等および本発明のDNAは、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの種々の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のポリペプチドなどが減少あるいは欠損しているために、細胞における情報伝達が十分に、あるいは正常に発揮されない患

者がいる場合に、（イ）本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のポリペプチド等を発現させることによって、（ロ）細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のポリペプチド等を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のポリペプチド等を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のポリペプチド等の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のポリペプチド等を上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のポリペプチド等は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のポリペプチド等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖または

5 サッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

10 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、
15 酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。
20 本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

25 本発明のポリペプチド等の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、免疫疾患の治療目的で本発明のポリペプチド等を経口投与する場合、一般的に成人（60 kg として）においては、一日につき該ポリペプチド等を約 1 mg ~ 1000 mg、好ましくは約 10 ~ 500 mg

g、より好ましくは約10～200mg投与する。非経口的に投与する場合は、該ポリペプチド等の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、免疫疾患の治療目的で本発明のポリペプチド等を注射剤の形で成人(体重60kgとして)に投与する場合、一日につき該ポリペプチド等を約1～1000mg程度、好ましくは約1～200mg程度、より好ましくは約10～100mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(2) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のポリペプチド等は生体内で液性因子として存在するため、本発明のポリペプチド等の機能を促進する化合物またはその塩は、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの治療・予防剤などの医薬として使用できる。

一方、本発明のポリペプチド等の機能を阻害する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチド等の産生過剰に起因する疾患の治療・予防剤などの医薬として使用できる。

したがって、本発明のポリペプチド等は、本発明のポリペプチド等の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明のポリペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその塩の機能を促進する化合物もしくはその塩(以下、促進剤と略記する場合がある)、または本発明のポリペプチドまたはその塩の機能を阻害する化合物(以下、阻害剤と略記する場合がある)のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドまたはその塩を含有するものである。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、

合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチド等の機能を促進または阻害する化合物である。

5 該化合物の塩としては、前記した本発明のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上記の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のポリペプチド等を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性
10 溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、炎症性疾患治療の目的で本発明のポリペプチド等の機能を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重
15 60 kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患など
20 によっても異なるが、例えば、炎症性疾患や免疫疾患治療の目的で本発明のポリペプチド等の機能を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たり
25 に換算した量を投与することができる。

一方、本発明のポリペプチド等の機能を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60 kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～

2-0mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、本発明のポリペプチド等の機能を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(3) 本発明のポリペプチドまたはその塩の定量

本発明のポリペプチド等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のポリペプチド等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチド等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のポリペプチド等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のポリペプチド等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチド等の定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチド等の定量法を提供する。

また、本発明のポリペプチド等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のポリペプチド等の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチド等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ポリペプチド量）に対応し

た抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、

5 感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

10
15

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ポリペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

20

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のポリペプチド量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定

25

感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチド等の結合する部位が異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のポリペプチド等のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

10 競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い
15 第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの
20 相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。
25

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常
条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチド等の

測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

- 15 以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のポリペプチド等を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のポリペプチド等の濃度を定量することによって、(1)本発明のポリペプチド等の濃度の減少が検出された場合、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のポリペプチド等を検出するために使用することができる。また、本発明のポリペプチド等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチド等の検出、被検細胞内における本発明のポリペプチドの挙動の分析などのために使用することができる。

(4) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまた

は温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下
5 や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナ
10 ショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the Natinal Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下が検出された場合
15 やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの疾病である可能性が高いと診断することができる。

（5）アンチセンスDNAを含有する医薬

20 本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内における本発明のポリペプチド等または本発明のDNAの機能を抑制することができるので、例えば、本発明のポリペプチドなどの発現過多に起因する疾患の治療・予防剤として使用することができる。

上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合、前記し
25 た本発明のDNAを含有する各種疾病の治療・予防剤と同様にして実施することができる。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルス

アソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与
5 できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

(6) 本発明の抗体を含有する医薬

- 10 本発明のポリペプチド等の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、本発明のポリペプチドなどの発現過多に起因する疾患の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

- 本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウ
15 サギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好
20 ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

- 本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許
25 容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒

剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80™、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500 mg、とりわけ注射剤では 5～100 mg、その他の剤形では 10～250 mg の上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

(7) DNA 転移動物

本発明は、外来性の本発明のポリペプチド等をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- 5 (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

- 10 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェク
- 15 ション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公
- 20 知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

- 非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的
- 25 短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどが挙げられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

- 5 本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

- 該異常DNAとしては、異常な本発明のポリペプチドを発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のポリペプチドの機能を抑制するポリペプチド
10 を発現させるDNAなどが用いられる。

- 本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明
15 のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。
20

- 本発明のポリペプチドの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウィルスなどが用いられる。なかでも、
25 大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

 上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウィルス

- (例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど)に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物(ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど)由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンI I、ウロプラキンI I、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK 1, K 10およびK 14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ(一般にTie 2と略される)、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素(Na, K-ATPase)、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原(H-2L)、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)、ポリペプチド鎖延長因子1 α (EF-1 α)、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部(VN P)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1 α (EF-1 α)のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

- 上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列(一般にターミネターと呼ばれる)を有していることが好ましく、例えば、ウィルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのス

プライミングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

5 該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外來性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性DNAを保持することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性DNAを有する。

15 本発明の外來性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

20 受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外來性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有する。

25 導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に

本発明のポリペプチドの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能亢進症や、本発明のポリペプチドが関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドに関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドによる正常ポリペプチドの機能阻害（dominant negative 作用）を解明するモデルとなる。

- 5 また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- 10 ①組織培養のための細胞源としての使用、
②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のポリペプチドにより特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドとの関連性についての解析、
15 ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
⑤本発明の変異ポリペプチドの単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

- 20 さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症などを含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のポリペプチドに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

- 25 また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのポリペプチド分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のポリペプチド産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、

またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のポリペプチドおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。

- さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不
5 活性型不応症を含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のポリペプチドが関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

10 (8) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- 15 (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、
- 20 (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- 25 (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を

促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のポリペプチドの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のポリペプチドの発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、poly A付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDN

A以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知
5 Evans と Kaufma の方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善した
10 BDF₁マウス(C57BL/6とDBA/2とのF₁)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代え
15 ることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。
20

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例として挙げることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。
25

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1-10000 U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養する方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans 及び M. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のポリペプチドの細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別

することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、
5 導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその
10 近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

20 該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全
25 個体であり、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のポリペプチドのホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に

導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

5 このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になる
10 ような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。
15

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のポリペプチドにより誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のポリペプチドの生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

20 (8a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病（例、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの疾病に対して治療・予防
25 効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物また

はその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが挙げられる。

- 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、
5 合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。
10

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

- 15 例えば、膵臓機能障害に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に糖負荷処置を行ない、糖負荷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の血糖値および体重変化などを経時的に測定する。

- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチド等の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患（例、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病など）に対して治療・
20 予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。
25

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加

塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

- 5 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。

- 10 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 15 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、炎症性疾患の治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、炎症性疾患の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

（8b）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

- 25 本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物

としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

5 試験化合物としては、前記と同様のものが挙げられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

10 本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) で置換している場合、本来、本発明のポリペプチドの発現する組織で、本発明のポリペプチドの代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド (X-gal) のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のポリペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、
20 本発明のポリペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、*lacZ* をコードするmRNAを検出してもよい。
25

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸）や塩基（例、有機酸）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、
5 硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を促進し、該ポリペプチドの機能を促進することが
10 できるので、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病などの疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

15 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドまたはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、
20 ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、癌、免疫疾患、呼吸器疾患、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患、感染症または神経系疾患や精神病など治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般
25 的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、炎症性疾患の治療目的で本発明の

DNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、
5 60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60 kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。
10
15

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

20

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。
25

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン

	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
5	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
10	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
15	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
20	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン
25	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
	Phe	: フェニルアラニン
	Tyr	: チロシン

	Trp	: トリプトファン
	Pro	: プロリン
	Asn	: アスパラギン
	Gln	: グルタミン
5	pGlu	: ピログルタミン酸

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	Me	: メチル基
	Et	: エチル基
10	Bu	: ブチル基
	Ph	: フェニル基
	TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
	Tos	: p-トルエンスルフォニル
	CHO	: ホルミル
15	Bzl	: ベンジル
	Cl ₂ Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
	Bom	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
20	Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	Boc	: t-ブトキシカルボニル
	DNP	: ジニトロフェニル
	Trt	: トリチル
	Bom	: t-ブトキシメチル
25	Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	HOObt	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1, 2, 3-ベンゾトリアジン

HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド

DCC : N, N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号： 1]

- 5 本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-480 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号： 2]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-546 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号： 3]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-595 のアミノ酸配列を示す。

- 10 [配列番号： 4]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-623 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号： 5]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-624 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号： 6]

- 15 本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-625 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号： 7]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-628 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号： 8]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-708 のアミノ酸配列を示す。

- 20 [配列番号： 9]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-711 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号： 10]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-714 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号： 11]

- 25 本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-715 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号： 12]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-749 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号： 13]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-768 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：14]

本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-772 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：15]

- 5 本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-790 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：16]

配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-480 をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：17]

- 10 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-546 をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：18]

配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-595 をコードする DNA の塩基配列を示す。

- 15 [配列番号：19]

配列番号：4 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-623 をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：20]

- 20 配列番号：5 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-624 をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：21]

配列番号：6 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-625 をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：22]

- 25 配列番号：7 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-628 をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：23]

配列番号：8 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド

ド TGC-708 をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：24]

配列番号：9 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-711 をコードする DNA の塩基配列を示す。

5 [配列番号：25]

配列番号：10 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-714 をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：26]

10 配列番号：11 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-715 をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：27]

配列番号：12 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-749 をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：28]

15 配列番号：13 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-768 をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：29]

配列番号：14 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-772 をコードする DNA の塩基配列を示す。

20 [配列番号：30]

配列番号：15 で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来ポリペプチド TGC-790 をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：31]

実施例1に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

25 [配列番号：32]

実施例1に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：33]

実施例2に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：34]

実施例2に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：35]

実施例3に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

5 [配列番号：36]

実施例3に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：37]

実施例4に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：38]

10 実施例4に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：39]

実施例5に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：40]

実施例5に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

15 [配列番号：41]

実施例6に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：42]

実施例6に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：43]

20 実施例7に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：44]

実施例7に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：45]

実施例8に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

25 [配列番号：46]

実施例8に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：47]

実施例9に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：48]

実施例9に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：49]

実施例10に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

5 [配列番号：50]

実施例10に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：51]

実施例11に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：52]

10 実施例11に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：53]

実施例12に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：54]

実施例12に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

15 [配列番号：55]

実施例13に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：56]

実施例13に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：57]

20 実施例14に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：58]

実施例14に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：59]

実施例15に記載の5'末端用プライマーの塩基配列を示す。

25 [配列番号：60]

実施例15に記載の3'末端用プライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：61]

実施例16に記載のプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：62]

実施例16に記載のプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：63]

実施例17に記載のプライマーの塩基配列を示す。

5 [配列番号：64]

実施例17に記載のプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：65]

実施例18に記載のプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：66]

10 実施例18に記載のプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：67]

実施例19に記載のプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：68]

実施例19に記載のプライマーの塩基配列を示す。

15 [配列番号：69]

実施例20に記載のプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：70]

実施例20に記載のプライマーの塩基配列を示す。

20 以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

実施例1 データベースからの TGC-480 の選択と塩基配列の解析

25 スミスクラインビーチャム (SB) 社から供給されている EST データベースの中から分泌のためのシグナル配列とプロセシング部位をコードすると思われるクローンを選択した。具体的には、各 EST の DNA 配列をアミノ酸配列に翻訳し、Met の後に疎水性アミノ酸 (Leu、Ile、Val、Ala など) のクラスタ

ーを有し、かつ同一フレーム内にプロセッシング部位に保存されている配列 (Arg-Arg, Lys-Arg, Lys-Lys) を有するクローンを選択した。その結果、これらの条件を満たすESTクローンとしてHGS:558273を発見した。ただし、EST配列では通常、塩基配列の欠失、挿入、読み違いなどの可能性があると同時に、cDNAの部分配列であるため、本クローンをTGC-480としてSB社から取り寄せ、該プラスミドの挿入DNA断片の全塩基配列を蛍光DNAシーケンサー (ABI PRISMTM 377, Perkin Elmer) を用いて決定した。その結果、本クローンの挿入配列 (cDNA) は配列番号: 1 で表される125アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号: 16 で表される378塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列の、N末端の21アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、脳、精巣、心臓などでも発現していることが判明した。

なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち配列番号: 16 に記載の塩基配列から5'末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー (例えば、ATGGCCAAGTACCTGGCCCAGATCA 及び TCACGTATGGGGCATCTGCCCTTTT) を作製し、上記の組織のcDNAライブラリー (例えば、脳、精巣、心臓など) や上記の組織由来のmRNAを鋳型にしたRT-PCRで取得できる。具体的には、プライマーを各々5 pmol、100 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 9.0) 5 μ l、500 mM 塩化カリウム溶液 5 μ l、25 mM 塩化マグネシウム溶液 3 μ l、2.5 mM デオキシリボヌクレオチド溶液 4 μ l、cDNA溶液 1 μ l、およびTaKaRa Taq™ 0.5 μ lを含む混合液50 μ lを調製し、TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (宝酒造(株)) を用いて最初に95℃で1分間置いた後、95℃で30秒、65℃で1分、72℃で2分を1サイクルとして35サイクル各反応を繰り返し、さらに72℃、10分間反応させるプログラムでPCR反応を行うことで、目的のPCR断片が得られる。

実施例 2 データベースからの TGC-546 の選択と塩基配列の解析

実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:447917 を選択した後、本クローンを TGC-546 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列 (cDNA) は配列番号: 2 で表される 121 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号: 17 で表される 366 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号: 2 で表されるアミノ酸配列の、N末端の 23 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、精巣上体で発現していることが判明した。

- 10 なお、該 cDNA 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号: 17 に記載の塩基配列から 5' 末端と 3' 末端に対応する PCR 用のプライマー (例えば、ATGCACAGATCAGAGCCATTTCTGA 及び TTACAGTAGTGGCAGTAACACTTGG など) を作製し、上記の組織の cDNA ライブラリー (例えば、精巣上体など) や上記の組織由来の mRNA を鋳型にした RT-PCR で取得できる。PCR の反応条件は、
- 15 実施例 1 に記載の方法が用いられる。

実施例 3 データベースからの TGC-595 の選択と塩基配列の解析

実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:1006634 を選択した後、本クローンを TGC-595 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列 (cDNA) は配列番号: 3 で表される 223 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号: 18 で表される 672 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号: 3 で表されるアミノ酸配列の、N末端の 19 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、脊髄、T細胞、網膜などで発現していることが判明した。

25 なお、該 cDNA 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号: 18 に記載の塩基配列から 5'

- 末端と 3' 末端に対応する P C R 用のプライマー（例えば、ATGAAGTTCGTCCCCTGCCTCCTGC 及び TCACCCTCGGAAGAAGCTGATGAGA）を作製し、上記の組織の c D N A ライブラリー（例えば、脊髄、T 細胞、網膜など）や上記の組織由来の m R N A を鋳型にした R T - P C R で取得できる。P C R の反応条件は、実施例 1 に記載の方法が用いられる。
- 5

実施例 4 データベースからの TGC-623 の選択と塩基配列の解析

- 実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:92551 を選択した後、本クローンを TGC-623 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（c D N A）は配列番号：4 で表される 2 4 8 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：1 9 で表される 7 4 7 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：4 で表されるアミノ酸配列の、N 末端の 2 1 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、小脳、副腎などで発現していることが判明した。
- 10

- 15 なお、該 c D N A 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：1 9 に記載の塩基配列から 5' 末端と 3' 末端に対応する P C R 用のプライマー（例えば、ATGGGACCTGTGCGGTTGGAATAT 及び TCAAAGATCTTCTCGGTCAAGTTTG）を作製し、上記の組織の c D N A ライブラリー（例えば、小脳、副腎など）や上記の組織由来の m R N A を鋳型にした R T - P C R で取得できる。P C R の反応条件は、実施例 1 に記載の方法が用いられる。
- 20

実施例 5 データベースからの TGC-624 の選択と塩基配列の解析

- 実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:1731120 を選択した後、本クローンを TGC-624 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（c D N A）は配列番号：5 で表される 1 7 3 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：2 0 で表される 5 2 2 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：5 で表されるアミノ
- 25

酸配列の、N末端の19アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、樹状細胞、T細胞などで発現していることが判明した。

5 なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法
で実施することができる。すなわち、配列番号：20に記載の塩基配列から5'
末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー（例えば、
ATGTTTGGCCACTGAACTCATCC及びTCATGAAAATATCCATTCTACCTTG）を作製し、上
記の組織のcDNAライブラリー（例えば、樹状細胞、T細胞など）や上記の
組織由来のmRNAを鋳型にしたRT-PCRで取得できる。PCRの反応条
10 件は、実施例1に記載の方法が用いられる。

実施例6 データベースからのTGC-625の選択と塩基配列の解析

実施例1で記載した同様の方法でHGS:1014817を選択した後、本クローンを
TGC-625として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの
15 挿入配列（cDNA）は配列番号：6で表される261アミノ酸残基のポリペ
プチドをコードする、配列番号：21で表される786塩基のオープンリーデ
ィングフレームを有していることが判明した。配列番号：6で表されるアミノ
酸配列の、N末端の20アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想され
る。また、本クローンは、血管内皮細胞、骨髄などで発現していることが判明
20 した。

なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法
で実施することができる。すなわち、配列番号：21に記載の塩基配列から5'
末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー（例えば、
ATGGAAGTCTTCAAGTGACCATTC及びTCAGTTCTTGTTTTTCCTTGTGCA）を作製し、上
25 記の組織のcDNAライブラリー（例えば、血管内皮細胞、骨髄など）や上記
の組織由来のmRNAを鋳型にしたRT-PCRで取得できる。PCRの反応
条件は、実施例1に記載の方法が用いられる。

実施例7 データベースからの TGC-628 の選択と塩基配列の解析

実施例1で記載した同様の方法で HGS:1878022 を選択した後、本クローンを TGC-628 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列 (cDNA) は配列番号: 7 で表される 243 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号: 22 で表される 732 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号: 7 で表されるアミノ酸配列の、N末端の 30 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、胸腺、胎盤などで発現していることが判明した。

10 なお、該 cDNA 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号: 22 に記載の塩基配列から 5' 末端と 3' 末端に対応する PCR 用のプライマー (例えば、ATGCGACCCCAGGGCCCCGCCGCT 及び TTATTTTGGTAGTTCTTCAATAATG) を作製し、上記の組織の cDNA ライブラリー (例えば、胸腺、胎盤など) や上記の組織由来の mRNA を鋳型にした RT-PCR で取得できる。PCR の反応条件は、
15 実施例1に記載の方法が用いられる。

実施例8 データベースからの TGC-708 の選択と塩基配列の解析

実施例1で記載した同様の方法で HGS:2346555 を選択した後、本クローンを TGC-708 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列 (cDNA) は配列番号: 8 で表される 149 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号: 23 で表される 450 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号: 8 で表されるアミノ酸配列の、N末端の 18 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、単球で発現していることが判明した。

25 なお、該 cDNA 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号: 23 に記載の塩基配列から 5' 末端と 3' 末端に対応する PCR 用のプライマー (例えば、ATGAAGTTACAGTGTGTTTCCCTTT 及び TCAGGAGGCCGATGGGGGCCAGCAC) を作製し、上

記の組織の cDNA ライブラリー（例えば、単球など）や上記の組織由来の mRNA を鋳型にした RT-PCR で取得できる。PCR の反応条件は、実施例 1 に記載の方法が用いられる。

5 実施例 9 データベースからの TGC-711 の選択と塩基配列の解析

実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:809616 を選択した後、本クローンを TGC-711 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（cDNA）は配列番号：9 で表される 136 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：24 で表される 411 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：9 で表されるアミノ酸配列の、N 末端の 20 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、小脳、肺などで発現していることが判明した。

なお、該 cDNA 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：24 に記載の塩基配列から 5'

15 末端と 3' 末端に対応する PCR 用のプライマー（例えば、ATGGCCAGCCTGGGGCTGCTGCTCC 及び TCATGAGGCTCCTGCAGAGGTCTGA）を作製し、上記の組織の cDNA ライブラリー（例えば、小脳、肺など）や上記の組織由来の mRNA を鋳型にした RT-PCR で取得できる。PCR の反応条件は、実施例 1 に記載の方法が用いられる。

20

実施例 10 データベースからの TGC-714 の選択と塩基配列の解析

実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:1260352 を選択した後、本クローンを TGC-714 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（cDNA）は配列番号：10 で表される 123 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：25 で表される 372 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：10 で表されるアミノ酸配列の、N 末端の 22 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、精巣上体で発現していることが判明した。

25

なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：25に記載の塩基配列から5'末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー（例えば、ATGAACTCCTGCTGCTGGCTCTTC及びTCATGAGCTATGGTGAACATTTGGA）を作製し、上記の組織のcDNAライブラリー（例えば、精巣上体など）や上記の組織由来のmRNAを鋳型にしたRT-PCRで取得できる。PCRの反応条件は、実施例1に記載の方法が用いられる。

実施例11 データベースからのTGC-715の選択と塩基配列の解析

10 実施例1で記載した同様の方法でHGS:81772を選択した後、本クローンをTGC-715として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（cDNA）は配列番号：11で表される163アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：26で表される492塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：11で表されるアミノ酸配列の、N末端の20アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、精巣上体で発現していることが判明した。

15 20 なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：26に記載の塩基配列から5'末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー（例えば、ATGGGCGGCCTGCTGCTGGCTGCTT及びCTACTGTGACAGGAAGCCCAGGCTC）を作製し、上記の組織のcDNAライブラリー（例えば、精巣上体など）や上記の組織由来のmRNAを鋳型にしたRT-PCRで取得できる。PCRの反応条件は、実施例1に記載の方法が用いられる。

25 実施例12 データベースからのTGC-749の選択と塩基配列の解析

実施例1で記載した同様の方法でHGS:1379897を選択した後、本クローンをTGC-749として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（cDNA）は配列番号：12で表される301アミノ酸残基のポリ

ペプチドをコードする、配列番号：27で表される906塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：12で表されるアミノ酸配列の、N末端の18アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、T細胞、胎盤、肝臓、大腸などで発現していることが判明した。

なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：27に記載の塩基配列から5'末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー（例えば、ATGGCCCGGCATGGGTTACCGCTGC及びTTACAGCTCCCCTGGCGGCCGGCCT）を作製し、上記の組織のcDNAライブラリー（例えば、T細胞、胎盤、肝臓、大腸など）や上記の組織由来のmRNAを鋳型にしたRT-PCRで取得できる。PCRの反応条件は、実施例1に記載の方法が用いられる。

実施例13 データベースからのTGC-768の選択と塩基配列の解析

実施例1で記載した同様の方法でHGS:398232を選択した後、本クローンをTGC-768として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列（cDNA）は配列番号：13で表される69アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号：28で表される210塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号：13で表されるアミノ酸配列の、N末端の26アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、精巣で発現していることが判明した。

なお、該cDNA断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号：28に記載の塩基配列から5'末端と3'末端に対応するPCR用のプライマー（例えば、ATGTGCTGGCTGCGGGCATGGGGCC及びTTATCTATTCATCATATATTCTTA）を作製し、上記の組織のcDNAライブラリー（例えば、精巣など）や上記の組織由来のmRNAを鋳型にしたRT-PCRで取得できる。PCRの反応条件は、実施例1に記載の方法が用いられる。

実施例 1 4 データベースからの TGC-772 の選択と塩基配列の解析

実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:2079036 を選択した後、本クローンを TGC-772 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列 (cDNA) は配列番号: 1 4 で表される 6 9 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号: 2 9 で表される 2 1 0 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号: 1 4 で表されるアミノ酸配列の、N末端の 2 3 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想される。また、本クローンは、脾臓、胎盤などで発現していることが判明した。

10 なお、該 cDNA 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号: 2 9 に記載の塩基配列から 5' 末端と 3' 末端に対応する P C R 用のプライマー (例えば、ATGGGGTTCCCGGCCGCGCGCTGC 及び CTACGCCGAGACCGTGGGCCTGCGG) を作製し、上記の組織の cDNA ライブラリー (例えば、脾臓、胎盤など) や上記の組織由来の mRNA を鋳型にした R T - P C R で取得できる。P C R の反応条件は、
15 実施例 1 に記載の方法が用いられる。

実施例 1 5 データベースからの TGC-790 の選択と塩基配列の解析

実施例 1 で記載した同様の方法で HGS:2450362 を選択した後、本クローンを TGC-790 として取り寄せ、塩基配列の確認を行った。その結果、本クローンの挿入配列 (cDNA) は配列番号: 1 5 で表される 1 9 7 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする、配列番号: 3 0 で表される 5 9 4 塩基のオープンリーディングフレームを有していることが判明した。配列番号: 1 5 で表されるアミノ酸配列の、N末端の 2 6 アミノ酸残基が分泌のためのシグナル配列と予想
25 される。また、本クローンは、胎盤で発現していることが判明した。

なお、該 cDNA 断片を取得する場合は、上記の情報を基にし、通常の方法で実施することができる。すなわち、配列番号: 3 0 に記載の塩基配列から 5' 末端と 3' 末端に対応する P C R 用のプライマー (例えば、

ATGCGAGGTGGCAAATGCAACATGC 及び TCATAAACTTGTGTTGGGCTTTAGG) を作製し、上記の組織の cDNA ライブラリー (例えば、胎盤など) や上記の組織由来の mRNA を鋳型にした RT-PCR で取得できる。PCR の反応条件は、実施例 1 に記載の方法が用いられる。

5

実施例 16 TGC-480 産物の COS7 細胞での分泌発現

TGC-480 産物を動物細胞中で発現させるための発現ベクターは、TGC-480 産物をコードする ORF を含む DNA 断片を、動物細胞用発現ベクター pCAN618 に挿入することによって得た。

- 10 まず、実施例 1 で得られた TGC-480 タンパクをコードしている cDNA 断片を鋳型にして、翻訳開始コドンの直前に制限酵素 Eco RI 認識部位がくるように設計した合成 DNA [5' - TCGGAATTCGCCATGGCCAAGTACCTGGCCCAGATC - 3' : (配列番号 : 61)] と、TGC-480 タンパクの C 末端に 8 アミノ酸からなる FLAG 配列 (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) とそれに続いて終止コドン
- 15 及び制限酵素 Xho I 認識部位がくるように設計した合成 DNA [5' - ACGCTCGAGTTACTTGTTCATCGTCGTCCTGTAGTCCGTATGGGGCATCTGCCCTTTTTC - 3' : (配列番号 : 62)] を用いて PCR を行なった。PCR 反応には Pyrobest DNA Polymerase (宝酒造) を用い、94℃ 1 分の後、98℃ 10 秒、60℃ 30 秒、72℃ 1 分を 25 回の後、72℃ 10 分の伸長反応を行なって TGC-480 の ORF
- 20 を含む DNA 断片を得た。この DNA 断片を制限酵素 Eco RI 及び Xho I で切断し、pCAN618 の Eco RI/Xho I 部位に挿入してヒト TGC-480 タンパクの動物細胞での発現ベクター pCAN618/TGC-480FLAG を得た。

- 25 COS7 細胞 4×10^5 を、10% の FBS (ウシ胎児血清) を含む DMEM (培地 ; Gibco BRL) 中、6-well plate で 24 時間培養した。この細胞に、発現ベクター pCAN618 /TGC480FLAG DNA を LipofectAMINE (GibcoBRL) を用いて導入し、さらに 18 時間培養した。次に培地を 0.05% CHAPS を含む Opti-MEM (培地 ; GibcoBRL) に換えてさらに 24 時間培養し、培養上清を回収した。上清は遠心によって浮いている細胞を除いた後、限外濾過 (Centricon-10 ; Amicon) で 10 倍にま

で濃縮し、2-メルカプトエタノールを含む同量の SDS-Sample Buffer を加えて 10 - 25% SDS-PAGE (TEFCO) で電気泳動した。これを PVDF 膜 (Amersham) に移して Western Blot 解析を行なった。一次抗体として、抗 FLAG マウス IgG (10 μ g/ml ; Sigma) を用い、二次抗体には HRP (Horseradish peroxidase) 標識抗マウス IgG 抗体 (2000 倍希釈 ; Amersham) を用い、
5 発色は ECLplus Western Blot Detection System (Amersham) を用いて行なった。その結果、TGC-480 タンパクは培養上清中に分泌されることが分った (図 1) 。

10 実施例 17 TGC-623 産物の COS7 細胞での分泌発現

TGC-623 産物を動物細胞中で発現させるための発現ベクターは、TGC-623 産物をコードする ORF を含む DNA 断片を、動物細胞用発現ベクター pCAN618FLAG に挿入することによって得た。pCAN618FLAG はプラスミドベクター pCAN618 に由来し、Sal I 部位直後に存在する 8 アミノ酸の FLAG 配列
15 (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) をコードする塩基配列と終止コドンに読取り枠を合わせることで、該目的タンパクを FLAG 融合タンパクとして発現させることが可能である。

まず、実施例 4 で得られた TGC-623 タンパクをコードしている cDNA 断片を鋳型にして、翻訳開始コドンの直前に制限酵素 Eco RI 認識部位がくるように
20 設計した合成 DNA [5' - TAGACGAATTCCACCATGGGACCTGTGCGGTTGGGAATATTGC - 3' : (配列番号 : 67)] と、TGC-623 タンパクの C 末端に制限酵素 Sal I 認識部位がくるように設計した合成 DNA [5' - AGGCAAGTCGACAAGATCT-TCTCGGTCAAGTTTGGGGTGGCTTCCTGTCTTGGTCAT - 3' : (配列番号 : 68)] を用いて PCR を行なった。PCR 反応には Pyrobest DNA Polymerase (Takara) を
25 用い、94℃ 1 分の後、98℃ 10 秒、57℃ 30 秒、72℃ 1 分を 25 回の後、72℃ 10 分の伸長反応を行なって TGC-623 の ORF を含む DNA 断片を得た。この DNA 断片を制限酵素 Eco RI 及び Sal I で切断し、pCAN618FLAG の Eco RI/Sal I 部位に挿入してヒト TGC-623 タンパクの動物細胞での発現ベ

クター pCAN618/TGC-623FLAG を得た。この発現ベクターを、実施例 16 と同様の方法で COS7 細胞に導入し、培養上清を調製して Western Blot 解析を行なった。その結果、TGC-623 タンパクは培養上清中に分泌されることが分った (図 1)。

5

実施例 18 TGC-711 産物の COS7 細胞での分泌発現

TGC-711 産物を動物細胞中で発現させるための発現ベクターは、実施例 16 に示した TGC-480 産物の場合と同様の方法で得た。

まず、実施例 9 で得られた TGC-711 タンパクをコードしている cDNA 断片を
10 鋳型にして、翻訳開始コドンの直前に制限酵素 Eco RI 認識部位がくるように設計した合成 DNA [5' - TCGGAATTCGCCATGGCCAGCCTGGGGCTGCTGCTC - 3' : (配列番号: 63)] と、TGC-711 タンパクの C 末端に 8 アミノ酸からなる FLAG 配列 (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp- Asp-Asp-Lys) とそれに続いて終止コドン及び制限酵素 Xho I 認識部位がくるように設計した合成 DNA [5' -
15 ACGCTCGAGTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAAGTCTGAGGCTCCTGCAGAGGTCTGAGA- 3' : (配列番号: 64)] を用いて PCR を行なった。PCR 及びその後の処理は実施例 16 と同様の条件で行ない、ヒト TGC-711 タンパクの動物細胞での発現ベクター pCAN618/TGC-711FLAG を得た。この発現ベクターを、実施例 16 と同様の方法で COS7 細胞に導入し、培養上清を調製して Western Blot 解析を行なった。
20 その結果、TGC-711 タンパクは培養上清中に分泌されることが分った (図 1)。

実施例 19 TGC-714 産物の COS7 細胞での分泌発現

TGC-714 産物を動物細胞中で発現させるための発現ベクターは、実施例 16 に示した TGC-480 産物の場合と同様の方法で得た。

25 まず、実施例 10 で得られた TGC-714 タンパクをコードしている cDNA 断片を鋳型にして、翻訳開始コドンの直前に制限酵素 Eco RI 認識部位がくるように設計した合成 DNA [5' - TCGGAATTCACCATGAACTCCTGCTGCTGGCTCTT - 3' : (配列番号: 65)] と、TGC-714 タンパクの C 末端に 8 アミノ酸からなる

- FLAG 配列 (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp- Asp-Asp-Lys) とそれに続いて終止コドン及び制限酵素 Xho I 認識部位がくるように設計した合成 DNA [5' - ACGCTCGAGTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCTGAGCTATGGTGAACATTTGGAAG - 3' : (配列番号 : 66)] を用いて PCR を行なった。PCR 反応には Pyrobese DNA Polymerase (宝酒造) を用い、94℃ 1 分の後、98℃ 10 秒、55℃ 30 秒、72℃ 30 秒を 25 回の後、72℃ 10 分の伸長反応を行なって TGC-714 の ORF を含む DNA 断片を得た。この DNA 断片を制限酵素 Eco RI 及び Xho I で切断し、pCAN618 の Eco RI/Xho I 部位に挿入してヒト TGC-714 タンパクの動物細胞での発現ベクター pCAN618/TGC-714FLAG を得た。
- 10 この発現ベクターを、実施例 16 と同様の方法で COS7 細胞に導入し、培養上清を調製して Western Blot 解析を行なった。その結果、TGC-714 タンパクは培養上清中に分泌されることが分った (図 1) 。

実施例 20 TGC-715 産物の COS7 細胞での分泌発現

- 15 TGC-715 産物を動物細胞中で発現させるための発現ベクターは、実施例 17 に示した TGC-623 産物の場合と同様の方法で得た。

- まず、実施例 11 で得られた TGC-715 タンパクをコードしている cDNA 断片を鋳型にして、翻訳開始コドンの直前に制限酵素 Eco RI 認識部位がくるように設計した合成 DNA [5' - GTGTAGAATTCACCATGGGCGGCCTGCTGCTGGCTGCTTTTCTGGCTTT - 3' : (配列番号 : 69)] と、TGC-715 タンパクの C 末端に制限酵素 Sal I 認識部位がくるように設計した合成 DNA [5' - CTGGGCGTCGACCTGTGACAGGAAGCCCAGGCTCCTGCTCCACT - 3' : (配列番号 : 70)] を用いて PCR を行なった。PCR は実施例 16 と同様の条件で行ない、得られた DNA 断片は実施例 17 と同様の方法で pCAN618FLAG の Eco RI/Sal I 部位に挿入してヒト TGC-715 タンパクの動物細胞での発現ベクター pCAN618/TGC-715FLAG を得た。この発現ベクターを、実施例 16 と同様の方法で COS7 細胞に導入し、培養上清を調製して Western Blot 解析を行なった。その結果、TGC-715 タンパクは培養上清中に分泌される

ことが分った（図1）。

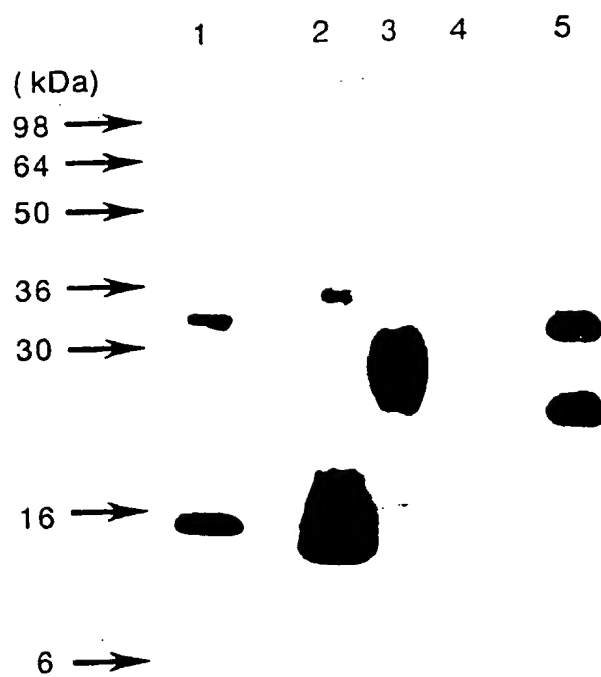
産業上の利用可能性

- 本発明のポリペプチドは、例えば生物学、生理学、薬理学、医学などの基礎研究目的のための組織マーカー、癌マーカー、分子量マーカー、病態マーカー、
- 5 本発明のポリペプチドに対する結合タンパクの検出などのために使用することができる。また、本発明のポリペプチドは1つ以上の生物活性を有していることが予想され、例えば、抗癌作用、抗炎症作用、造血作用、抗血液凝固作用、細胞遊走作用、細胞増殖刺激作用、細胞分化誘導作用、免疫調節作用、リガン
- 10 ド作用などを有している可能性が考えられることから、それらの作用に起因する病気の診断、治療、予防に使用することができる。さらに、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドを特異的に認識することが
- 15 できるので、被検液中の本発明のポリペプチドの検出、定量、中和などに使用することができる。

請求の範囲

1. 配列番号：1ないし配列番号：15から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドまたはその塩。
2. 請求項1記載のポリペプチドをコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ポリペプチドを生成せしめることを特徴とする請求項1記載のポリペプチドまたはその塩の製造法。
3. 請求項1記載のポリペプチドまたはその塩に対する抗体。
4. 請求項1記載のポリペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
5. 請求項1記載のポリペプチドまたはその塩を含有してなる請求項1記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
6. 請求項4記載のスクリーニング方法または請求項5記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。
7. 請求項4記載のスクリーニング方法または請求項5記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項1記載のポリペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。
8. 請求項1記載のポリペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

☒ 1



SEQUENCE LISTINGS

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Polypeptide

<130> 2609W00P

<150> JP 11-140229

<151> 1999-05-20

<160> 70

<210> 1

<211> 125

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Ala Lys Tyr Leu Ala Gln Ile Ile Val Met Gly Val Gln Val Val

5

10

15

Gly Arg Ala Phe Ala Arg Ala Leu Arg Gln Glu Phe Ala Ala Ser Arg

20

25

30

Ala Ala Ala Asp Ala Arg Gly Arg Ala Gly His Arg Ser Ala Ala Ala

35

40

45

Ser Asn Leu Ser Gly Leu Ser Leu Gln Glu Ala Gln Gln Ile Leu Asn

50

55

60

Val Ser Lys Leu Ser Pro Glu Glu Val Gln Lys Asn Tyr Glu His Leu

65

70

75

80

Phe Lys Val Asn Asp Lys Ser Val Gly Gly Ser Phe Tyr Leu Gln Ser

85

90

95

Lys Val Val Arg Ala Lys Glu Arg Leu Asp Glu Glu Leu Lys Ile Gln

100

105

110

Ala Gln Glu Asp Arg Glu Lys Gly Gln Met Pro His Thr

115

120

125

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Met His Arg Ser Glu Pro Phe Leu Lys Met Ser Leu Leu Ile Leu Leu

5

10

15

Phe Leu Gly Leu Ala Glu Ala Cys Thr Pro Arg Glu Val Asn Leu Leu

20

25

30

Lys Gly Ile Ile Gly Leu Met Ser Arg Leu Ser Pro Asp Glu Ile Leu

35

40

45

Gly Leu Leu Ser Leu Gln Val Leu His Glu Glu Thr Ser Gly Cys Lys

50

55

60

Glu Glu Val Lys Pro Phe Ser Gly Thr Thr Pro Ser Arg Lys Pro Leu

65

70

75

80

Pro Lys Arg Lys Asn Thr Trp Asn Phe Leu Lys Cys Ala Tyr Met Val

85

90

95

Met Thr Tyr Leu Phe Val Ser Tyr Asn Lys Gly Asp Trp Phe Thr Phe

100

105

110

Ser Ser Gln Val Leu Leu Pro Leu Leu

115

120

<210> 3

<211> 223

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Met Lys Phe Val Pro Cys Leu Leu Leu Val Thr Leu Ser Cys Leu Gly
5 10 15
Thr Leu Gly Gln Ala Pro Arg Gln Lys Gln Gly Ser Thr Gly Glu Glu
20 25 30
Phe His Phe Gln Thr Gly Gly Arg Asp Ser Cys Thr Met Arg Pro Ser
35 40 45
Ser Leu Gly Gln Gly Ala Gly Glu Val Trp Leu Arg Val Asp Cys Arg
50 55 60
Asn Thr Asp Gln Thr Tyr Trp Cys Glu Tyr Arg Gly Gln Pro Ser Met
65 70 75 80
Cys Gln Ala Phe Ala Ala Asp Pro Lys Ser Tyr Trp Asn Gln Ala Leu
85 90 95
Gln Glu Leu Arg Arg Leu His His Ala Cys Gln Gly Ala Pro Val Leu
100 105 110
Arg Pro Ser Val Cys Arg Glu Ala Gly Pro Gln Ala His Met Gln Gln
115 120 125
Val Thr Ser Ser Leu Lys Gly Ser Pro Glu Pro Asn Gln Gln Pro Glu
130 135 140
Ala Gly Thr Pro Ser Leu Ser Pro Lys Ala Thr Val Lys Leu Thr Gly
145 150 155 160
Ala Thr Gln Leu Gly Lys Asp Ser Met Glu Glu Leu Gly Lys Ala Lys
165 170 175
Pro Thr Thr Gly Pro Thr Ala Lys Pro Thr Gln Pro Gly Pro Arg Pro
180 185 190
Gly Gly Asn Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Trp Glu His Cys Trp Lys
195 200 205
Pro Phe Gln Ala Leu Cys Ala Phe Leu Ile Ser Phe Phe Arg Gly
210 215 220

<210> 4

<211> 248

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Met Gly Pro Val Arg Leu Gly Ile Leu Leu Phe Leu Phe Leu Ala Val

5 10 15

His Glu Ala Trp Ala Gly Met Leu Lys Glu Glu Asp Asp Asp Thr Glu

20 25 30

Arg Leu Pro Ser Lys Cys Glu Val Cys Lys Leu Leu Ser Thr Glu Leu

35 40 45

Gln Ala Glu Leu Ser Arg Thr Gly Arg Ser Arg Glu Val Leu Glu Leu

50 55 60

Gly Gln Val Leu Asp Thr Gly Lys Arg Lys Arg His Val Pro Tyr Ser

65 70 75 80

Val Ser Glu Thr Arg Leu Glu Glu Ala Leu Glu Asn Leu Cys Glu Arg

85 90 95

Ile Leu Asp Tyr Ser Val His Ala Glu Arg Lys Gly Ser Leu Arg Tyr

100 105 110

Ala Lys Gly Gln Ser Gln Thr Met Ala Thr Leu Lys Gly Leu Val Gln

115 120 125

Lys Gly Val Lys Val Asp Leu Gly Ile Pro Leu Glu Leu Trp Asp Glu

130 135 140

Pro Ser Val Glu Val Thr Tyr Leu Lys Lys Gln Cys Glu Thr Met Leu

145 150 155 160

Glu Glu Phe Glu Asp Ile Val Gly Asp Trp Tyr Phe His His Gln Glu

165 170 175

Gln Pro Leu Gln Asn Phe Leu Cys Glu Gly His Val Leu Pro Ala Ala
 180 185 190

Glu Thr Ala Cys Leu Gln Glu Thr Trp Thr Gly Lys Glu Ile Thr Asp
 195 200 205

Gly Glu Glu Lys Thr Glu Gly Glu Glu Glu Gln Glu Glu Glu Glu
 210 215 220

Glu Glu Glu Glu Glu Gly Gly Asp Lys Met Thr Lys Thr Gly Ser His
 225 230 235 240

Pro Lys Leu Asp Arg Glu Asp Leu
 245

<210> 5

<211> 173

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Met Phe Cys Pro Leu Lys Leu Ile Leu Leu Pro Val Leu Leu Asp Tyr
 5 10 15

Ser Leu Gly Leu Asn Asp Leu Asn Val Ser Pro Pro Glu Leu Thr Val
 20 25 30

His Val Gly Asp Ser Ala Leu Met Gly Cys Val Phe Gln Ser Thr Glu
 35 40 45

Asp Lys Cys Ile Phe Lys Ile Asp Trp Thr Leu Ser Pro Gly Glu His
 50 55 60

Ala Lys Asp Glu Tyr Val Leu Tyr Tyr Tyr Ser Asn Leu Ser Val Pro
 65 70 75 80

Ile Gly Arg Phe Gln Asn Arg Val His Leu Met Gly Asp Ile Leu Cys
 85 90 95

Asn Asp Gly Ser Leu Leu Leu Gln Asp Val Gln Glu Ala Asp Gln Gly
 100 105 110
 Thr Tyr Ile Cys Glu Ile Arg Leu Lys Gly Glu Ser Gln Val Phe Lys
 115 120 125
 Lys Ala Val Val Leu His Val Leu Pro Glu Glu Pro Lys Glu Leu Met
 130 135 140
 Val His Val Gly Gly Leu Ile Gln Met Gly Cys Val Phe Gln Ser Thr
 145 150 155 160
 Glu Val Lys His Val Thr Lys Val Glu Trp Ile Phe Ser
 165 170

<210> 6

<211> 261

<212> PRT

<213> Human

<400> 6

Met Glu Leu Leu Gln Val Thr Ile Leu Phe Leu Leu Pro Ser Ile Cys
 5 10 15
 Ser Ser Asn Ser Thr Gly Val Leu Glu Ala Ala Asn Asn Ser Leu Val
 20 25 30
 Val Thr Thr Thr Lys Pro Ser Ile Thr Thr Pro Asn Thr Glu Ser Leu
 35 40 45
 Gln Lys Asn Val Val Thr Pro Thr Thr Gly Thr Thr Pro Lys Gly Thr
 50 55 60
 Ile Thr Asn Glu Leu Leu Lys Met Ser Leu Met Ser Thr Ala Thr Phe
 65 70 75 80
 Leu Thr Ser Lys Asp Glu Gly Leu Lys Ala Thr Thr Thr Asp Val Arg
 85 90 95

Lys Asn Asp Ser Ile Ile Ser Asn Val Thr Val Thr Ser Val Thr Leu
100 105 110

Pro Asn Ala Val Ser Thr Leu Gln Ser Ser Lys Pro Lys Thr Glu Thr
115 120 125

Gln Ser Ser Ile Lys Thr Thr Glu Ile Pro Gly Ser Val Leu Gln Pro
130 135 140

Asp Ala Ser Pro Ser Lys Thr Gly Thr Leu Thr Ser Ile Pro Val Thr
145 150 155 160

Ile Pro Glu Asn Thr Ser Gln Ser Gln Val Ile Gly Thr Glu Gly Gly
165 170 175

Lys Asn Ala Ser Thr Ser Ala Thr Ser Arg Ser Tyr Ser Ser Ile Ile
180 185 190

Leu Pro Val Val Ile Ala Leu Ile Val Ile Thr Leu Ser Val Phe Val
195 200 205

Leu Val Gly Leu Tyr Arg Met Cys Trp Lys Ala Asp Pro Gly Thr Pro
210 215 220

Glu Asn Gly Asn Asp Gln Pro Gln Ser Asp Lys Glu Ser Val Lys Leu
225 230 235 240

Leu Thr Val Lys Thr Ile Ser His Glu Ser Gly Glu His Ser Ala Gln
245 250 255

Gly Lys Thr Lys Asn
260

<210> 7

<211> 243

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

Met Arg Pro Gln Gly Pro Ala Ala Ser Pro Gln Arg Leu Arg Gly Leu
5 10 15
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Leu Pro Ala Pro Ser Ser Ala Ser Glu
20 25 30
Ile Pro Lys Gly Lys Gln Lys Ala Gln Leu Arg Gln Arg Glu Val Val
35 40 45
Asp Leu Tyr Asn Gly Met Cys Leu Gln Gly Pro Ala Gly Val Pro Gly
50 55 60
Arg Asp Gly Ser Pro Gly Ala Asn Gly Ile Pro Gly Thr Pro Gly Ile
65 70 75 80
Pro Gly Arg Asp Gly Phe Lys Gly Glu Lys Gly Glu Cys Leu Arg Glu
85 90 95
Ser Phe Glu Glu Ser Trp Thr Pro Asn Tyr Lys Gln Cys Ser Trp Ser
100 105 110
Ser Leu Asn Tyr Gly Ile Asp Leu Gly Lys Ile Ala Glu Cys Thr Phe
115 120 125
Thr Lys Met Arg Ser Asn Ser Ala Leu Arg Val Leu Phe Ser Gly Ser
130 135 140
Leu Arg Leu Lys Cys Arg Asn Ala Cys Cys Gln Arg Trp Tyr Phe Thr
145 150 155 160
Phe Asn Gly Ala Glu Cys Ser Gly Pro Leu Pro Ile Glu Ala Ile Ile
165 170 175
Tyr Leu Asp Gln Gly Ser Pro Glu Met Asn Ser Thr Ile Asn Ile His
180 185 190
Arg Thr Ser Ser Val Glu Gly Leu Cys Glu Gly Ile Gly Ala Gly Leu
195 200 205
Val Asp Val Ala Ile Trp Val Gly Thr Cys Ser Asp Tyr Pro Lys Gly
210 215 220

Asp Ala Ser Thr Gly Trp Asn Ser Val Ser Arg Ile Ile Ile Glu Glu
225 230 235 240

Leu Pro Lys

<210> 8

<211> 149

<212> PRT

<213> Human

<400> 8

Met Lys Leu Gln Cys Val Ser Leu Trp Leu Leu Gly Thr Ile Leu Ile
5 10 15

Leu Cys Ser Val Asp Asn His Gly Leu Arg Arg Cys Leu Ile Ser Thr
20 25 30

Asp Met His His Ile Glu Glu Ser Phe Gln Glu Ile Lys Arg Ala Ile
35 40 45

Gln Ala Lys Asp Thr Phe Pro Asn Val Thr Ile Leu Ser Thr Leu Glu
50 55 60

Thr Leu Gln Ile Ile Lys Pro Leu Asp Val Cys Cys Val Thr Lys Asn
65 70 75 80

Leu Leu Ala Phe Tyr Val Asp Arg Val Phe Lys Asp His Gln Glu Pro
85 90 95

Asn Pro Lys Ile Leu Arg Lys Ile Ile Ser Ile Cys Gln Leu Phe Pro
100 105 110

Leu His Ala Glu Asn Ser Ala Ala Met Cys Glu Ser Leu Gly Gln Asn
115 120 125

Ser Ser Ile Cys Ser Leu Ser Ala Gln Gly Glu Ala Arg Lys Cys Trp
130 135 140

Pro Pro Ser Ala Ser

145

<210> 9

<211> 136

<212> PRT

<213> Human

<400> 9

Met Ala Ser Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Thr Ala Leu Pro

5

10

15

Pro Leu Trp Ser Ser Ser Leu Pro Gly Leu Asp Thr Ala Glu Ser Lys

20

25

30

Ala Thr Ile Ala Asp Leu Ile Leu Ser Ala Leu Glu Arg Ala Thr Val

35

40

45

Phe Leu Glu Gln Arg Leu Pro Glu Ile Asn Leu Asp Gly Met Val Gly

50

55

60

Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Lys Ser Val Arg Glu Lys Trp Ala

65

70

75

80

Gln Glu Pro Leu Leu Gln Pro Leu Ser Leu Arg Val Gly Met Leu Gly

85

90

95

Glu Lys Leu Glu Ala Ala Ile Gln Arg Ser Leu His Tyr Leu Lys Leu

100

105

110

Ser Asp Pro Lys Tyr Leu Arg Gly Arg Thr Ala Ala Ser Pro Ala Ala

115

120

125

Ser Gln Thr Ser Ala Gly Ala Ser

130

135

<210> 10

<211> 123

<212> PRT

<213> Human

<400> 10

Met Lys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Met Leu Val Leu Leu Pro Gln

5

10

15

Val Ile Pro Ala Tyr Ser Gly Glu Lys Lys Cys Trp Asn Arg Ser Gly

20

25

30

His Cys Arg Lys Gln Cys Lys Asp Gly Glu Ala Val Lys Asp Thr Cys

35

40

45

Lys Asn Leu Arg Ala Cys Cys Ile Pro Ser Asn Glu Asp His Arg Arg

50

55

60

Val Pro Ala Thr Ser Pro Thr Pro Leu Ser Asp Ser Thr Pro Gly Ile

65

70

75

80

Ile Asp Asp Ile Leu Thr Val Arg Phe Thr Thr Asp Tyr Phe Glu Val

85

90

95

Ser Ser Lys Lys Asp Met Val Glu Glu Ser Glu Ala Gly Arg Gly Thr

100

105

110

Glu Thr Ser Leu Pro Asn Val His His Ser Ser

115

120

<210> 11

<211> 163

<212> PRT

<213> Human

<400> 11

Met Gly Gly Leu Leu Leu Ala Ala Phe Leu Ala Leu Val Ser Val Pro

5

10

15

Arg Ala Gln Ala Val Trp Leu Gly Arg Leu Asp Pro Glu Gln Leu Leu

20

25

30

Gly Pro Trp Tyr Val Leu Ala Val Ala Ser Arg Glu Lys Gly Phe Ala

35

40

45

Met Glu Lys Asp Met Lys Asn Val Val Gly Val Val Val Thr Leu Thr

50

55

60

Pro Glu Asn Asn Leu Arg Thr Leu Ser Ser Gln His Gly Leu Gly Gly

65

70

75

80

Cys Asp Gln Ser Val Met Asp Leu Ile Lys Arg Asn Ser Gly Trp Val

85

90

95

Phe Glu Asn Pro Ser Ile Gly Val Leu Glu Leu Trp Val Leu Ala Thr

100

105

110

Asn Phe Arg Asp Tyr Ala Ile Ile Phe Thr Gln Leu Glu Phe Gly Asp

115

120

125

Glu Pro Phe Asn Thr Val Glu Leu Tyr Ser Leu Thr Glu Thr Ala Ser

130

135

140

Gln Glu Ala Met Gly Leu Phe Thr Lys Trp Ser Arg Ser Leu Gly Phe

145

150

155

160

Leu Ser Gln

<210> 12

<211> 301

<212> PRT

<213> Human

<400> 12

Met Ala Arg His Gly Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Ser Leu Leu Val

5

10

15

Gly Ala Trp Leu Lys Leu Gly Asn Gly Gln Ala Thr Ser Met Val Gln

20

25

30

Leu Gln Gly Gly Arg Phe Leu Met Gly Thr Asn Ser Pro Asp Ser Arg

35

40

45

Asp Gly Glu Gly Pro Val Arg Glu Ala Thr Val Lys Pro Phe Ala Ile

50

55

60

Asp Ile Phe Pro Val Thr Asn Lys Asp Phe Arg Asp Phe Val Arg Glu
65 70 75 80
Lys Lys Tyr Arg Thr Glu Ala Glu Met Phe Gly Trp Ser Phe Val Phe
85 90 95
Glu Asp Phe Val Ser Asp Glu Leu Arg Asn Lys Ala Thr Gln Pro Met
100 105 110
Lys Ser Val Leu Trp Trp Leu Pro Val Glu Lys Ala Phe Trp Arg Gln
115 120 125
Pro Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ile Arg Glu Arg Leu Glu His Pro Val
130 135 140
Leu His Val Ser Trp Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Cys Ala Trp Arg Gly
145 150 155 160
Lys Arg Leu Pro Thr Glu Glu Glu Trp Glu Phe Ala Ala Arg Gly Gly
165 170 175
Leu Lys Gly Gln Val Tyr Pro Trp Gly Asn Trp Phe Gln Pro Asn Arg
180 185 190
Thr Asn Leu Trp Gln Gly Lys Phe Pro Lys Gly Asp Lys Ala Glu Asp
195 200 205
Gly Phe His Gly Val Ser Pro Val Asn Ala Phe Pro Ala Gln Asn Asn
210 215 220
Tyr Gly Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Asn Val Trp Glu Trp Thr Ala Ser
225 230 235 240
Pro Tyr Gln Ala Ala Glu Gln Asp Met Arg Val Leu Arg Gly Ala Ser
245 250 255
Trp Ile Asp Thr Ala Asp Gly Ser Ala Asn His Arg Ala Arg Val Thr
260 265 270
Thr Arg Met Gly Asn Thr Pro Asp Ser Ala Ser Asp Asn Leu Gly Phe
275 280 285

Arg Cys Ala Ala Asp Ala Gly Arg Pro Pro Gly Glu Leu

290

295

300

<210> 13

<211> 69

<212> PRT

<213> Human

<400> 13

Met Cys Trp Leu Arg Ala Trp Gly Gln Ile Leu Leu Pro Val Phe Leu

5

10

15

Ser Leu Phe Leu Ile Gln Leu Leu Ile Ser Phe Ser Glu Asn Gly Phe

20

25

30

Ile His Ser Pro Arg Asn Asn Gln Lys Pro Arg Asp Gly Asn Glu Glu

35

40

45

Glu Cys Ala Val Lys Lys Ser Cys Gln Leu Cys Thr Glu Asp Lys Lys

50

55

60

Tyr Met Met Asn Arg

65

<210> 14

<211> 69

<212> PRT

<213> Human

<400> 14

Met Gly Phe Pro Ala Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu

5

10

15

Leu Ala Pro Ala Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Arg Cys Ser Trp

20

25

30

Arg Gly Arg Pro Arg Arg Thr Arg Thr Ser Ala Ala Ala Trp Pro Pro

35

40

45

Ser Ala Leu Ser Cys Ala Arg Thr Gly Ala Pro Ser Cys Pro Arg Arg

50

55

60

Pro Thr Val Ser Ala

65

<210> 15

<211> 197

<212> PRT

<213> Human

<400> 15

Met Arg Gly Gly Lys Cys Asn Met Leu Ser Ser Leu Gly Cys Leu Leu

5

10

15

Leu Cys Gly Ser Ile Thr Leu Ala Leu Gly Asn Ala Gln Lys Leu Pro

20

25

30

Lys Gly Lys Arg Pro Asn Leu Lys Val His Ile Asn Thr Thr Ser Asp

35

40

45

Ser Ile Leu Leu Lys Phe Leu Arg Pro Ser Pro Asn Val Lys Leu Glu

50

55

60

Gly Leu Leu Leu Gly Tyr Gly Ser Asn Val Ser Pro Asn Gln Tyr Phe

65

70

75

80

Pro Leu Pro Ala Glu Gly Lys Phe Thr Glu Ala Ile Val Asp Ala Glu

85

90

95

Pro Lys Tyr Leu Ile Val Val Arg Pro Ala Pro Pro Pro Ser Gln Lys

100

105

110

Lys Ser Cys Ser Gly Lys Thr Arg Ser Arg Lys Pro Leu Gln Leu Val

115

120

125

Val Gly Thr Leu Thr Pro Ser Ser Val Phe Leu Ser Trp Gly Phe Leu

130

135

140

AGTGGCTGCA AGGAGGAAGT TAAACCCTTC TCAGGCACCA CCCCATCCAG GAAACCACTC 240
CCCAAGAGGA AGAACACGTG GAACTTCCTG AAATGCGCCT ACATGGTGAT GACCTACCTC 300
TTCGTATCCT ACAACAAAGG GGA CTGGTTC ACTTTTTCCT CCCAAGTGTT ACTGCCACTA 360
CTGTAA

366

<210> 18

<211> 672

<212> DNA

<213> Human

<400> 18

ATGAAGTTCG TCCCCTGCCT CCTGCTGGTG ACCTTGTCCT GCCTGGGGAC TTTGGGTCAG 60
GCCCCGAGGC AAAAGCAAGG AAGCACTGGG GAGGAATTCC ATTTCCAGAC TGGAGGGAGA 120
GATTCCTGCA CTATGCGTCC CAGCAGCTTG GGGCAAGGTG CTGGAGAAGT CTGGCTTCGC 180
GTCGACTGCC GCAACACAGA CCAGACCTAC TGGTGTGAGT ACAGGGGGCA GCCCAGCATG 240
TGCCAGGCTT TCGCTGCTGA CCCCAAATCT TACTGGAATC AAGCCCTGCA GGAGCTGAGG 300
CGCCTTCACC ATGCGTGCCA GGGGGCCCCG GTGCTTAGGC CATCCGTGTG CAGGGAGGCT 360
GGACCCAGG CCCATATGCA GCAGGTGACT TCCAGCCTCA AGGGCAGCCC AGAGCCCAAC 420
CAGCAGCCTG AGGCTGGGAC GCCATCTCTG AGCCCCAAGG CCACAGTGAA ACTCACAGGA 480
GCAACACAGC TGGGAAAGGA CTCGATGGAA GAGCTGGGAA AAGCCAAACC CACCACCGGA 540
CCCACAGCCA AACCTACCCA GCCTGGACCC AGGCCCGGAG GGAATGAGGA AGCAAAGAAG 600
AAGGCCTGGG AACATTGTTG GAAACCCTTC CAGGCCCTGT GCGCCTTTCT CATCAGCTTC 660
TTCCGAGGGT GA

672

<210> 19

<211> 747

<212> DNA

<213> Human

<400> 19

ATGGGACCTG TGCGGTTGGG AATATTGCTT TTCCTTTTTT TGGCCGTGCA CGAGGCTTGG 60
GCTGGGATGT TGAAGGAGGA GGACGATGAC ACAGAACGCT TGCCCAGCAA ATGCGAAGTG 120
TGTAAGCTGC TGAGCACAGA GCTACAGGCG GAACTGAGTC GCACCGGTCG ATCTCGAGAG 180
GTGCTGGAGC TGGGGCAGGT GCTGGATACA GGCAAGAGGA AGAGACACGT GCCTTACAGC 240
GTTTCAGAGA CAAGGCTGGA AGAGGCCTTA GAGAATTTAT GTGAGCGGAT CCTGGACTAT 300
AGTGTTACAG CTGAGCGCAA GGGCTCACTG AGATATGCCA AGGGTCAGAG TCAGACCATG 360
GCAACACTGA AAGGCCTAGT GCAGAAGGGG GTGAAGGTGG ATCTGGGGAT CCCTCTGGAG 420
CTTTGGGATG AGCCCAGCGT GGAGGTCACA TACCTCAAGA AGCAGTGTGA GACCATGTTG 480
GAGGAGTTTG AAGACATTGT GGGAGACTGG TACTTCCACC ATCAGGAGCA GCCCCTACAA 540
AATTTTCTCT GTGAAGGTCA TGTGCTCCCA GCTGCTGAAA CTGCATGTCT ACAGGAAACT 600
TGGACTGGAA AGGAGATCAC AGATGGGGAA GAGAAAACAG AAGGGGAGGA AGAGCAGGAG 660
GAGGAGGAGG AAGAGGAGGA AGAGGAAGGG GGAGACAAGA TGACCAAGAC AGGAAGCCAC 720
CCCAAACCTG ACCGAGAAGA TCTTTGA 747

<210> 20

<211> 522

<212> DNA

<213> Human

<400> 20

ATGTTTTGCC CACTGAAACT CATCCTGCTG CCAGTGTTAC TGGATTATTC CTTGGGCCTG 60
AATGACTTGA ATGTTTCCCC GCCTGAGCTA ACAGTCCATG TGGGTGATTC AGCTCTGATG 120
GGATGTGTTT TCCAGAGCAC AGAAGACAAA TGTATATTCA AGATAGACTG GACTCTGTCA 180
CCAGGAGAGC ACGCCAAGGA CGAATATGTG CTATACTATT ACTCCAATCT CAGTGTGCCT 240
ATTGGGCGCT TCCAGAACCG CGTACACTTG ATGGGGGACA TCTTATGCAA TGATGGCTCT 300
CTCCTGCTCC AAGATGTGCA AGAGGCTGAC CAGGGAACCT ATATCTGTGA AATCCGCCTC 360
AAAGGGGAGA GCCAGGTGTT CAAGAAGGCG GTGGTACTGC ATGTGCTTCC AGAGGAGCCC 420
AAAGAGCTCA TGGTCCATGT GGGTGGATTG ATTCAGATGG GATGTGTTTT CCAGAGCACA 480
GAAGTGAAC ACGTGACCAA GGTAGAATGG ATATTTTCAT GA 522

<210> 21

<211> 786

<212> DNA

<213> Human

<400> 21

ATGGAAGTGC TTCAAGTGAC CATTCTTTTT CTTCTGCCCCA GTATTTGCAG CAGTAACAGC 60
ACAGGTGTTT TAGAGGCAGC TAATAATTCA CTTGTTGTGA CTACAACAAA ACCATCTATA 120
ACAACACCAA ACACAGAATC ATTACAGAAA AATGTTGTCA CACCAACAAC TGAACAACCT 180
CCTAAAGGAA CAATCACCAA TGAATTACTT AAAATGTCTC TGATGTCAAC AGCTACTTTT 240
TTAACAAGTA AAGATGAAGG ATTGAAAGCC ACAACCACTG ATGTCAGGAA GAATGACTCC 300
ATCATTTCAG ACGTAACAGT AACAAGTGTT ACACTTCCAA ATGCTGTTTC AACATTACAA 360
AGTTCCAAAC CCAAGACTGA AACTCAGAGT TCAATTAAAA CAACAGAAAT ACCAGGTAGT 420
GTTCTACAAC CAGATGCATC ACCTTCTAAA ACTGGTACAT TAACCTCAAT ACCAGTTACA 480
ATTCCAGAAA ACACCTCACA GTCTCAAGTA ATAGGCACTG AGGGTGGAAA AAATGCAAGC 540
ACTTCAGCAA CCAGCCGGTC TTATTCCAGT ATTATTTTGC CGGTGGTTAT TGCTTTGATT 600
GTAATAACAC TTTCACTATT TGTCTGGTG GGTGTGTACC GAATGTGCTG GAAGGCAGAT 660
CCGGGCACAC CAGAAAATGG AAATGATCAA CCTCAGTCTG ATAAAGAGAG CGTGAAGCTT 720
CTTACCGTTA AGACAATTC TCATGAGTCT GGTGAGCACT CTGCACAAGG AAAAACCAAG 780
AACTGA

786

<210> 22

<211> 732

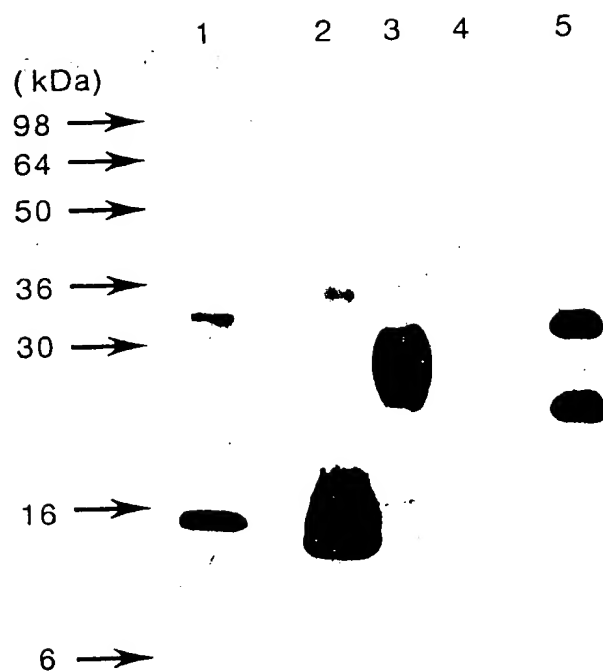
<212> DNA

<213> Human

<400> 22

ATGCGACCCC AGGGCCCCGC CGCCTCCCCG CAGCGGCTCC GCGGCCTCCT GCTGCTCCTG 60
CTGCTGCAGC TGCCCGCGCC GTCGAGCGCC TCTGAGATCC CCAAGGGGAA GCAAAAGGCG 120
CAGCTCCGGC AGAGGGAGGT GGTGGACCTG TATAATGGAA TGTGCTTACA AGGGCCAGCA 180
GGAGTGCCTG GTCGAGACGG GAGCCCTGGG GCCAATGGCA TTCCGGGTAC ACCTGGGATC 240

Fig.1



THIS PAGE BLANK (U8PTO)

SEQUENCE LISTINGS

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Polypeptide

<130> 2609W00P

<150> JP 11-140229

<151> 1999-05-20

<160> 70

<210> 1

<211> 125

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Ala Lys Tyr Leu Ala Gln Ile Ile Val Met Gly Val Gln Val Val

5

10

15

Gly Arg Ala Phe Ala Arg Ala Leu Arg Gln Glu Phe Ala Ala Ser Arg

20

25

30

Ala Ala Ala Asp Ala Arg Gly Arg Ala Gly His Arg Ser Ala Ala Ala

35

40

45

Ser Asn Leu Ser Gly Leu Ser Leu Gln Glu Ala Gln Gln Ile Leu Asn

50

55

60

Val Ser Lys Leu Ser Pro Glu Glu Val Gln Lys Asn Tyr Glu His Leu

65

70

75

80

Phe Lys Val Asn Asp Lys Ser Val Gly Gly Ser Phe Tyr Leu Gln Ser

85

90

95

Lys Val Val Arg Ala Lys Glu Arg Leu Asp Glu Glu Leu Lys Ile Gln

100

105

110

Ala Gln Glu Asp Arg Glu Lys Gly Gln Met Pro His Thr

115 120 125
 <210> 2
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 2
 Met His Arg Ser Glu Pro Phe Leu Lys Met Ser Leu Leu Ile Leu Leu
 5 10 15
 Phe Leu Gly Leu Ala Glu Ala Cys Thr Pro Arg Glu Val Asn Leu Leu
 20 25 30
 Lys Gly Ile Ile Gly Leu Met Ser Arg Leu Ser Pro Asp Glu Ile Leu
 35 40 45
 Gly Leu Leu Ser Leu Gln Val Leu His Glu Glu Thr Ser Gly Cys Lys
 50 55 60
 Glu Glu Val Lys Pro Phe Ser Gly Thr Thr Pro Ser Arg Lys Pro Leu
 65 70 75 80
 Pro Lys Arg Lys Asn Thr Trp Asn Phe Leu Lys Cys Ala Tyr Met Val
 85 90 95
 Met Thr Tyr Leu Phe Val Ser Tyr Asn Lys Gly Asp Trp Phe Thr Phe
 100 105 110
 Ser Ser Gln Val Leu Leu Pro Leu Leu
 115 120

<210> 3
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 3
 Met Lys Phe Val Pro Cys Leu Leu Leu Val Thr Leu Ser Cys Leu Gly
 5 10 15

Thr Leu Gly Gln Ala Pro Arg Gln Lys Gln Gly Ser Thr Gly Glu Glu
 20 25 30
 Phe His Phe Gln Thr Gly Gly Arg Asp Ser Cys Thr Met Arg Pro Ser
 35 40 45
 Ser Leu Gly Gln Gly Ala Gly Glu Val Trp Leu Arg Val Asp Cys Arg
 50 55 60
 Asn Thr Asp Gln Thr Tyr Trp Cys Glu Tyr Arg Gly Gln Pro Ser Met
 65 70 75 80
 Cys Gln Ala Phe Ala Ala Asp Pro Lys Ser Tyr Trp Asn Gln Ala Leu
 85 90 95
 Gln Glu Leu Arg Arg Leu His His Ala Cys Gln Gly Ala Pro Val Leu
 100 105 110
 Arg Pro Ser Val Cys Arg Glu Ala Gly Pro Gln Ala His Met Gln Gln
 115 120 125
 Val Thr Ser Ser Leu Lys Gly Ser Pro Glu Pro Asn Gln Gln Pro Glu
 130 135 140
 Ala Gly Thr Pro Ser Leu Ser Pro Lys Ala Thr Val Lys Leu Thr Gly
 145 150 155 160
 Ala Thr Gln Leu Gly Lys Asp Ser Met Glu Glu Leu Gly Lys Ala Lys
 165 170 175
 Pro Thr Thr Gly Pro Thr Ala Lys Pro Thr Gln Pro Gly Pro Arg Pro
 180 185 190
 Gly Gly Asn Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Trp Glu His Cys Trp Lys
 195 200 205
 Pro Phe Gln Ala Leu Cys Ala Phe Leu Ile Ser Phe Phe Arg Gly
 210 215 220

<210> 4

<211> 248

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Met Gly Pro Val Arg Leu Gly Ile Leu Leu Phe Leu Phe Leu Ala Val

5 10 15

His Glu Ala Trp Ala Gly Met Leu Lys Glu Glu Asp Asp Asp Thr Glu

20 25 30

Arg Leu Pro Ser Lys Cys Glu Val Cys Lys Leu Leu Ser Thr Glu Leu

35 40 45

Gln Ala Glu Leu Ser Arg Thr Gly Arg Ser Arg Glu Val Leu Glu Leu

50 55 60

Gly Gln Val Leu Asp Thr Gly Lys Arg Lys Arg His Val Pro Tyr Ser

65 70 75 80

Val Ser Glu Thr Arg Leu Glu Glu Ala Leu Glu Asn Leu Cys Glu Arg

85 90 95

Ile Leu Asp Tyr Ser Val His Ala Glu Arg Lys Gly Ser Leu Arg Tyr

100 105 110

Ala Lys Gly Gln Ser Gln Thr Met Ala Thr Leu Lys Gly Leu Val Gln

115 120 125

Lys Gly Val Lys Val Asp Leu Gly Ile Pro Leu Glu Leu Trp Asp Glu

130 135 140

Pro Ser Val Glu Val Thr Tyr Leu Lys Lys Gln Cys Glu Thr Met Leu

145 150 155 160

Glu Glu Phe Glu Asp Ile Val Gly Asp Trp Tyr Phe His His Gln Glu

165 170 175

Gln Pro Leu Gln Asn Phe Leu Cys Glu Gly His Val Leu Pro Ala Ala

180 185 190

Glu Thr Ala Cys Leu Gln Glu Thr Trp Thr Gly Lys Glu Ile Thr Asp

195 200 205

Gly Glu Glu Lys Thr Glu Gly Glu Glu Glu Gln Glu Glu Glu Glu

210

215

220

Glu Glu Glu Glu Glu Gly Gly Asp Lys Met Thr Lys Thr Gly Ser His

225

230

235

240

Pro Lys Leu Asp Arg Glu Asp Leu

245

<210> 5

<211> 173

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Met Phe Cys Pro Leu Lys Leu Ile Leu Leu Pro Val Leu Leu Asp Tyr

5

10

15

Ser Leu Gly Leu Asn Asp Leu Asn Val Ser Pro Pro Glu Leu Thr Val

20

25

30

His Val Gly Asp Ser Ala Leu Met Gly Cys Val Phe Gln Ser Thr Glu

35

40

45

Asp Lys Cys Ile Phe Lys Ile Asp Trp Thr Leu Ser Pro Gly Glu His

50

55

60

Ala Lys Asp Glu Tyr Val Leu Tyr Tyr Tyr Ser Asn Leu Ser Val Pro

65

70

75

80

Ile Gly Arg Phe Gln Asn Arg Val His Leu Met Gly Asp Ile Leu Cys

85

90

95

Asn Asp Gly Ser Leu Leu Leu Gln Asp Val Gln Glu Ala Asp Gln Gly

100

105

110

Thr Tyr Ile Cys Glu Ile Arg Leu Lys Gly Glu Ser Gln Val Phe Lys

115

120

125

Lys Ala Val Val Leu His Val Leu Pro Glu Glu Pro Lys Glu Leu Met

130	135	140	
Val His Val Gly Gly Leu Ile Gln Met Gly Cys Val Phe Gln Ser Thr			
145	150	155	160
Glu Val Lys His Val Thr Lys Val Glu Trp Ile Phe Ser			
165	170		
<210> 6			
<211> 261			
<212> PRT			
<213> Human			
<400> 6			
Met Glu Leu Leu Gln Val Thr Ile Leu Phe Leu Leu Pro Ser Ile Cys			
5	10	15	
Ser Ser Asn Ser Thr Gly Val Leu Glu Ala Ala Asn Asn Ser Leu Val			
20	25	30	
Val Thr Thr Thr Lys Pro Ser Ile Thr Thr Pro Asn Thr Glu Ser Leu			
35	40	45	
Gln Lys Asn Val Val Thr Pro Thr Thr Gly Thr Thr Pro Lys Gly Thr			
50	55	60	
Ile Thr Asn Glu Leu Leu Lys Met Ser Leu Met Ser Thr Ala Thr Phe			
65	70	75	80
Leu Thr Ser Lys Asp Glu Gly Leu Lys Ala Thr Thr Thr Asp Val Arg			
85	90	95	
Lys Asn Asp Ser Ile Ile Ser Asn Val Thr Val Thr Ser Val Thr Leu			
100	105	110	
Pro Asn Ala Val Ser Thr Leu Gln Ser Ser Lys Pro Lys Thr Glu Thr			
115	120	125	
Gln Ser Ser Ile Lys Thr Thr Glu Ile Pro Gly Ser Val Leu Gln Pro			
130	135	140	

Asp Ala Ser Pro Ser Lys Thr Gly Thr Leu Thr Ser Ile Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Ile Pro Glu Asn Thr Ser Gln Ser Gln Val Ile Gly Thr Glu Gly Gly
 165 170 175
 Lys Asn Ala Ser Thr Ser Ala Thr Ser Arg Ser Tyr Ser Ser Ile Ile
 180 185 190
 Leu Pro Val Val Ile Ala Leu Ile Val Ile Thr Leu Ser Val Phe Val
 195 200 205
 Leu Val Gly Leu Tyr Arg Met Cys Trp Lys Ala Asp Pro Gly Thr Pro
 210 215 220
 Glu Asn Gly Asn Asp Gln Pro Gln Ser Asp Lys Glu Ser Val Lys Leu
 225 230 235 240
 Leu Thr Val Lys Thr Ile Ser His Glu Ser Gly Glu His Ser Ala Gln
 245 250 255
 Gly Lys Thr Lys Asn
 260

<210> 7

<211> 243

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

Met Arg Pro Gln Gly Pro Ala Ala Ser Pro Gln Arg Leu Arg Gly Leu
 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Leu Pro Ala Pro Ser Ser Ala Ser Glu
 20 25 30
 Ile Pro Lys Gly Lys Gln Lys Ala Gln Leu Arg Gln Arg Glu Val Val
 35 40 45
 Asp Leu Tyr Asn Gly Met Cys Leu Gln Gly Pro Ala Gly Val Pro Gly

50	55	60	
Arg Asp Gly Ser Pro Gly Ala Asn Gly Ile Pro Gly Thr Pro Gly Ile			
65	70	75	80
Pro Gly Arg Asp Gly Phe Lys Gly Glu Lys Gly Glu Cys Leu Arg Glu			
	85	90	95
Ser Phe Glu Glu Ser Trp Thr Pro Asn Tyr Lys Gln Cys Ser Trp Ser			
100	105	110	
Ser Leu Asn Tyr Gly Ile Asp Leu Gly Lys Ile Ala Glu Cys Thr Phe			
115	120	125	
Thr Lys Met Arg Ser Asn Ser Ala Leu Arg Val Leu Phe Ser Gly Ser			
130	135	140	
Leu Arg Leu Lys Cys Arg Asn Ala Cys Cys Gln Arg Trp Tyr Phe Thr			
145	150	155	160
Phe Asn Gly Ala Glu Cys Ser Gly Pro Leu Pro Ile Glu Ala Ile Ile			
	165	170	175
Tyr Leu Asp Gln Gly Ser Pro Glu Met Asn Ser Thr Ile Asn Ile His			
180	185	190	
Arg Thr Ser Ser Val Glu Gly Leu Cys Glu Gly Ile Gly Ala Gly Leu			
195	200	205	
Val Asp Val Ala Ile Trp Val Gly Thr Cys Ser Asp Tyr Pro Lys Gly			
210	215	220	
Asp Ala Ser Thr Gly Trp Asn Ser Val Ser Arg Ile Ile Ile Glu Glu			
225	230	235	240
Leu Pro Lys			

<210> 8

<211> 149

<212> PRT

<213> Human

<400> 8

CCAGGTCGGG ATGGATTCAA AGGAGAAAAG GGGGAATGTC TGAGGGAAAAG CTTTGAGGAG 300
TCCTGGACAC CCAACTACAA GCAGTGTTC TGGAGTTCAT TGAATTATGG CATAGATCTT 360
GGGAAAATTG CGGAGTGTAC ATTTACAAAG ATGCGTTCAA ATAGTGCTCT AAGAGTTTTG 420
TTCAGTGGCT CACTTCGGCT AAAATGCAGA AATGCATGCT GTCAGCGTTG GTATTTTACA 480
TTCAATGGAG CTGAATGTTC AGGACCTCTT CCCATTGAAG CTATAATTTA TTTGGACCAA 540
GGAAGCCCTG AAATGAATTC AACAATTAAT ATTCATCGCA CTTCTTCTGT GGAAGGACTT 600
TGTGAAGGAA TTGGTGCTGG ATTAGTGGAT GTTGCTATCT GGGTTGGCAC TTGTTCAGAT 660
TACCCAAAAG GAGATGCTTC TACTGGATGG AATTCAGTTT CTCGCATCAT TATTGAAGAA 720
CTACCAAAAT AA

732

<210> 23

<211> 450

<212> DNA

<213> Human

<400> 23

ATGAAGTTAC AGTGTGTTTC CCTTTGGCTC CTGGGTACAA TACTGATATT GTGCTCAGTA 60
GACAACCACG GTCTCAGGAG ATGTCTGATT TCCACAGACA TGCACCATAT AGAAGAGAGT 120
TTCCAAGAAA TCAAAAAGAGC CATCCAAGCT AAGGACACCT TCCCAAATGT CACTATCCTG 180
TCCACATTGG AGACTCTGCA GATCATTAAG CCCTTAGATG TGTGCTGCGT GACCAAGAAC 240
CTCCTGGCGT TCTACGTGGA CAGGGTGTTT AAGGATCATC AGGAGCCAAA CCCCAAAATC 300
TTGAGAAAAA TCATCAGCAT TTGCCAACTC TTTCTCTAC ATGCAGAAAA CTCTGCGGCA 360
ATGTGTGAGT CACTGGGTCA GAATTCCAGC ATCTGCTCCC TGTCTGCCCC AGGAGAGGCC 420
AGGAAGTGCT GGCCCCCATC GGCCTCCTGA 450

<210> 24

<211> 411

<212> DNA

<213> Human

<400> 24

ATGGCCAGCC TGGGGCTGCT GCTCCTGCTC TTACTGACAG CACTGCCACC GCTGTGGTCC 60
TCCTCACTGC CTGGGCTGGA CACTGCTGAA AGTAAAGCCA CCATTGCAGA CCTGATCCTG 120
TCTGCGCTGG AGAGAGCCAC CGTCTTCCTA GAACAGAGGC TGCCTGAAAT CAACCTGGAT 180
GGCATGGTGG GGGTCCGAGT GCTGGAAGAG CAGCTAAAAA GTGTCCGGGA GAAGTGGGCC 240
CAGGAGCCCC TGCTGCAGCC GCTGAGCCTG CGCGTGGGGA TGCTGGGGGA GAAGCTGGAG 300
GCTGCCATCC AGAGATCCCT CCACTACCTC AAGCTGAGTG ATCCCAAGTA CCTAAGAGGA 360
CGGACAGCAG CGAGCCCTGC GGCCTCTCAG ACCTCTGCAG GAGCCTCATG A 411

<210> 25

<211> 372

<212> DNA

<213> Human

<400> 25

ATGAAACTCC TGCTGCTGGC TCTTCCTATG CTTGTGCTCC TACCCCAAGT GATCCCAGCC 60
TATAGTGGTG AAAAAAATG CTGGAACAGA TCAGGGCACT GCAGGAAACA ATGCAAAGAT 120
GGAGAAGCAG TGAAAGATAC ATGCAAAAAT CTTGAGCTT GCTGCATTCC ATCCAATGAA 180
GACCACAGGC GAGTTCCTGC GACATCTCCC ACACCCTTGA GTGACTCAAC ACCAGGAATT 240
ATTGATGATA TTTTAACAGT AAGGTTACG ACAGACTACT TTGAAGTAAG CAGCAAGAAA 300
GATATGGTTG AAGAGTCTGA GCGGGAAGG GGAAGTGA CCTCTCTTCC AAATGTTTAC 360
CATAGCTCAT GA

372

<210> 26

<211> 492

<212> DNA

<213> Human

<400> 26

ATGGGCGGCC TGCTGCTGGC TGCTTTTCTG GCTTTGGTCT CGGTGCCAG GGCCAGGCC 60
GTGTGGTTGG GAAGACTGGA CCCTGAGCAG CTTCTGGGC CCTGGTACGT GCTTGCGGTG 120
GCCTCCCGGG AAAAGGGCTT TGCCATGGAG AAGGACATGA AGAACGTCGT GGGGGTGGTG 180

GTGACCCTCA CTCCAGAAAA CAACCTGCGG ACGCTGTCCT CTCAGCACGG GCTGGGAGGG 240
TGTGACCAGA GTGTCATGGA CCTGATAAAG CGAAACTCCG GATGGGTGTT TGAGAATCCC 300
TCAATAGGCG TGCTGGAGCT CTGGGTGCTG GCCACCAACT TCAGAGACTA TGCCATCATC 360
TTCCTCAGC TGGAGTTCGG GGACGAGCCC TTCAACACCG TGGAGCTGTA CAGTCTGACG 420
GAGACAGCCA GCCAGGAGGC CATGGGGCTC TTCACCAAGT GGAGCAGGAG CCTGGGCTTC 480
CTGTCACAGT AG

492

<210> 27

<211> 906

<212> DNA

<213> Human

<400> 27

ATGGCCCGGC ATGGGTACC GCTGCTGCCC CTGCTGTCGC TCCTGGTCGG CGCGTGGCTC 60
AAGCTAGGAA ATGGACAGGC TACTAGCATG GTCCAACTGC AGGGTGGGAG ATTCTTGATG 120
GGAACAAATT CTCCAGACAG CAGAGATGGT GAAGGGCCTG TGCGGGAGGC GACAGTGAAA 180
CCCTTTGCCA TCGACATATT TCCTGTCACC AACAAAGATT TCAGGGATTT TGTCAGGGAG 240
AAAAAGTATC GGACAGAAGC TGAGATGTTT GGATGGAGCT TTGTCTTTGA GGACTTTGTC 300
TCTGATGAGC TGAGAAACAA AGCCACCCAG CCAATGAAGT CTGTA CTCTG GTGGCTTCCA 360
GTGGAAAAGG CATTTTGGAG GCAGCCTGCA GGTCTGGCT CTGGCATCCG AGAGAGACTG 420
GAGCACCAG TGTTACACGT GAGCTGGAAT GACGCCCCGTG CCTACTGTGC TTGGCGGGGA 480
AAACGACTGC CCACGGAGGA AGAGTGGGAG TTTGCCGCCC GAGGGGGCTT GAAGGGTCAA 540
GTTTACCCAT GGGGGAAGTG GTTCCAGCCA AACCGCACCA ACCTGTGGCA GGGAAAGTTC 600
CCCAAGGGAG ACAAAGCTGA GGATGGCTTC CATGGAGTCT CCCCAGTGAA TGCTTTCCCC 660
GCCCAGAACA ACTACGGGCT CTATGACCTC CTGGGGAACG TGTGGGAGTG GACAGCATCA 720
CCGTACCAGG CTGCTGAGCA GGACATGCGC GTCCTCCGGG GGGCATCCTG GATCGACACA 780
GCTGATGGCT CTGCCAATCA CCGGGCCCCG GTCACCACCA GGATGGGCAA CACTCCAGAT 840
TCAGCCTCAG ACAACCTCGG TTTCCGCTGT GCTGCAGACG CAGGCCGGCC GCCAGGGGAG 900
CTGTAA

906

<210> 28

<211> 210

<212> DNA

<213> Human

<400> 28

ATGTGCTGGC TGC GG GCATG GGGCCAGATC CTCCTGCCAG TTTTCCTCTC CCTCTTTCTC 60
ATCCAATTGC TTATCAGCTT CTCAGAGAAT GGT TTTATCC ACAGCCCCAG GAACAATCAG 120
AAACCAAGAG ATGGGAATGA AGAGGAATGT GCTGTAAAGA AGAGTTGTCA ATTGTGCACA 180
GAAGATAAGA AATATATGAT GAATAGATAA 210

<210> 29

<211> 210

<212> DNA

<213> Human

<400> 29

ATGGGGTTCC CGGCCGCGGC GCTGCTCTGC GCGCTGTGCT GCGGCCTCCT GGCCCCGGCT 60
GCCCCGCGCCG GCTACTCCGA GGAGCGCTGC AGCTGGAGGG GCAGGCCACG CCGCACCAGG 120
ACATCAGCCG CCGCGTGGCC GCCTTCCGCT TTGAGCTGCG CGAGGACGGG CGCCCCGAGC 180
TGCCCCCGCA GGCCACGGT CTCGGCGTAG 210

<210> 30

<211> 594

<212> DNA

<213> Human

<400> 30

ATGCGAGGTG GCAAATGCAA CATGCTCTCC AGTTTGGGGT GTCTACTTCT CTGTGGAAGT 60
ATTACACTAG CCCTGGGAAA TGCACAGAAA TTGCCAAAAG GTAAAAGGCC AAACCTCAAA 120
GTCCACATCA ATACCACAAG TGA CTCCATC CTCTTGAAGT TCTTGCGTCC AAGTCCAAAT 180
GTAAAGCTTG AAGGTCTTCT CCTGGGATAT GGCAGCAATG TATCACCAA CCAGTACTTC 240

CCTCTTCCCG CTGAAGGGAA ATTACAGAA GCTATAGTTG ATGCAGAGCC GAAATATCTG 300
ATAGTTGTGC GACCTGCTCC ACCTCCAAGT CAAAAGAAGT CATGTTTCAGG TAAACTCGT 360
TCTCGCAAAC CTCTGCAGCT GGTGGTTGGC ACTCTGACAC CGAGCTCGGT CTTCTGTCC 420
TGGGGTTTCC TCATCAACCC ACACCATGAC TGGACATTGC CAAGTCACTG TCCCAATGAC 480
AGATTTTATA CAATTCGCTA TCGAGAAAAG GATAAAGAAA AGAAGTGGAT TTTTCAAATC 540
TGTCCAGCCA CTGAAACAAT TGTGGAAAAC CTAAAGCCCA ACACAAGTTT ATGA 594

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 31

ATGGCCAAGT ACCTGGCCCA GATCA 25

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 32

TCACGTATGG GGCATCTGCC CTTT 25

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 33

ATGCACAGAT CAGAGCCATT TCTGA 25

<210> 34

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 34

TTACAGTAGT GGCAGTAACA CTTGG 25

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 35

ATGAAGTTCG TCCCCTGCCT CCTGC 25

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 36

TCACCCTCGG AAGAAGCTGA TGAGA 25

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 37

ATGGGACCTG TGC GGTGGG AATAT 25

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 38

TCAAAGATCT TCTCGGTCAA GTTTG 25

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 39

ATGTTTTGCC CACTGAAACT CATCC 25

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 40

TCATGAAAAT ATCCATTCTA CCTTG 25

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 41

ATGGAAGTGC TTCAAGTGAC CATTC 25

<210> 42

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 42

TCAGTTCTTG GTTTTTCCTT GTGCA 25

<210> 43

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 43

ATGCGACCCC AGGGCCCCGC CGCCT 25

<210> 44

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 44

TTATTTTGGT AGTTCTTCAA TAATG 25

<210> 45

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 45

ATGAAGTTAC AGTGTGTTTC CCTTT 25

<210> 46

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 46

TCAGGAGGCC GATGGGGGCC AGCAC 25

<210> 47

<211> 25

<212> DNA

<220>

<223>

<213> Artificial Sequence

<400> 47

ATGGCCAGCC TGGGGCTGCT GCTCC 25

<210> 48

<211> 25

<212> DNA

<220>

<223>

<213> Artificial Sequence

<400> 48

TCATGAGGCT CCTGCAGAGG TCTGA 25

<210> 49

<211> 25

<212> DNA

<220>

<223>

<213> Artificial Sequence

<400> 49

ATGAAACTCC TGCTGCTGGC TCTTC 25

<210> 50

<211> 25

<212> DNA

<220>

<223>

<213> Artificial Sequence

<400> 50

TCATGAGCTA TGGTGAACAT TTGGA 25

<210> 51

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 51

ATGGGCGGCC TGCTGCTGGC TGCTT 25

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 52

CTACTGTGAC AGGAAGCCCA GGCTC 25

<210> 53

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 53

ATGGCCCGGC ATGGGTTACC GCTGC 25

<210> 54

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 54

TTACAGCTCC CCTGGCGGCC GGCCT 25

<210> 55

<211> 25

<212> DNA

<220>

<223>

<213> Artificial Sequence

<400> 55

ATGTGCTGGC TCGGGGCATG GGGCC 25

<210> 56

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 56

TTATCTATTC ATCATATATT TCTTA 25

<210> 57

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 57

ATGGGGTTCC CGGCCGCGGC GCTGC 25

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 58

CTACGCCGAG ACCGTGGGCC TCGG 25

<210> 59

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 59

ATGCGAGGTG GCAAATGCAA CATGC 25

<210> 60

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 60

TCATAAACTT GTGTTGGGCT TTAGG 25

<210> 61

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 61

TCGGAATTCG CCATGGCCAA GTACCTGGCC CAGATC 36

<210> 62

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 62

ACGCTCGAGT TACTTGTCAT CGTCGTCCTT GTAGTCCGTA TGGGGCATCT GCCCTTTTTC 60

<210> 63

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 63

TCGGAATTCG CCATGGCCAG CCTGGGGCTG CTGCTC 36

<210> 64

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 64

ACGCTCGAGT TACTTGTCAT CGTCGTCCTT GTAGTCTGAG GCTCCTGCAG AGGTCTGAGA 60

<210> 65

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 65

TCGGAATTCA CCATGAAACT CCTGCTGCTG GCTCTT 36

<210> 66

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 66

ACGCTCGAGT TACTTGTCAT CGTCGTCCTT GTAGTCTGAG CTATGGTGAA CATTGGAAG 60

<210> 67

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 67

TAGACGAATT CCCACCATGG GACCTGTGCG GTTGGAATA TTGC 44

<210> 68

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 68

AGGCAAGTCG ACAAGATCTT CTCGGTCAAG TTTGGGGTGG CTTCTGTCT TGGTCAT 57

<210> 69

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 69

GTGTAGAATT CCCACCATGG GCGGCCTGCT GCTGGCTGCT TTTCTGGCTT T 51

<210> 70

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 70

CTGGGCGTCG ACCTGTGACA GGAAGCCCAG GCTCCTGCTC CACT 44

SPECIFICATION

NOVEL POLYPEPTIDE

5 FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a novel secretory polypeptide, new uses of the secretory polypeptide.

BACKGROUND ART

10 Living bodies exert harmonized regulations involved in genesis, differentiation, growth, repairment and maintenance of homeostasis, via intercellular or intertissular transmission of information; in most of these occasions, extracellularly secreted protein factors play an important role as the information transmitters. For example, a series of secretory factors (humoral factor) called as cytokines occur as polypeptides
15 modified by sugar chains, with their molecular weights ranging from 20,000 to 50,000, and they are characterized as hormone-like molecules mainly exhibiting effects on immune and hematopoietic systems. Various monokines found as macrophage activating factors to be released from monocytes and migration-inhibitory factors, interferon α , β and γ characterized by activating relevant cells to induce anti-virus
20 activities, as well as polypeptides known as various lymphokines which are produced at T cells and postulated as lymphocyte proliferative differentiation factors have been consecutively reported so far, whereby they are usually classified as a member of cytokines in general. One of the characteristics of cytokines is known to predominantly exert their activities by either autocrine or paracrine modes. On the
25 other hand, humoral factors including peptide hormones and proliferative factors which are derived from endocrine tissues exhibit activities by endocrine properties; therefore, investigations searching for possible correlations between most of these humoral factors and diseases as well as research and development to pursue feasibility of them as ethical drugs are currently performed extensively.

30 In the meantime, most of these protein factors indicative of being important for living bodies have been mostly discovered either by using their intrinsic biological activities as the index or by virtue of structural similarity to those of previously known physiologically active polypeptides. However, given the sophisticated maintenance of homeostasis observed in higher animals including mammals, it is well postulated
35 that lots of unknown factors except for the physiologically active polypeptides or

peptides, which is publicly known are present and contribute to important functions. In recent years, by large scale determinations of base sequences in cDNA library not only from humans but also various organisms, and the genome structure analysis project, quite a few new candidates of genes have been verified; accordingly, computerized information processing technology is widely employed to anticipate possible functions of these gene products, prompting researchers to apply these findings to biology, medicine, veterinary medicine and agronomy [Trends in Biotechnology, Vol. 14, 294 (1996)]. Nevertheless, most of these sequence information is generally fragmental and incorrect, thereby leading to difficulty in selecting brand-new useful genes directly from them under the current situation. For example, partial miscoding is occasionally observed among the sequence information obtained by a large scale base sequence determination; therefore, it is necessary for us to rely on correct information on the base sequences and to objectively judge whether secretory factors (humoral factors) could be obtained by these base sequences so that we obtain correct evidence about open reading frame (ORF) and amino acid sequences. The present invention successfully verifies a novel humoral factor through a large scale cDNA sequence analysis and subsequent detailed analysis of relevant information from the viewpoint as stated above.

The objective of this invention is to disclose a novel humoral factor, thereby providing novel polypeptides, its partial peptides or salts thereof, recombinant vectors, transformants, which are applicable to biology, medicine, pharmaceutical field and veterinary medicine, manufacturing methods of the polypeptides, pharmaceutical components containing the polypeptides and partial polypeptides, as well as antibodies directed against the polypeptides.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

As a result of extensive investigations to solve the above-stated issues, the present inventors have selected cDNAs encoding novel secretory polypeptides among a large scale cDNA base sequence data base, followed by identification of plural numbers of structures of novel secretory polypeptides which meet the objectives of this investigation. Based on these findings, the present inventors have continued further extensive studies and as a result, have come to accomplish the present invention.

Thus, the present invention relates to the following features.

(1) A polypeptide comprising the same or substantially the same amino acid sequence as at least one (preferably, one) amino acid sequence selected among either

SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15, or a salt thereof.

(2) A manufacturing method for the polypeptide or its salt according to (1), which comprises culturing the transformant previously transformed with the recombinant vector containing the DNA encoding the polypeptide and accumulating the polypeptide according to (1).

(3) An antibody to the polypeptide or its salt according to (1).

(4) A method of screening a compound or its salt that either promotes or inhibits the activity of the polypeptide or its salt according to (1), which comprises using the polypeptide or its salts according to (1).

(5) A kit for screening a compound or its salt that either promotes or inhibits the activity of the polypeptide or its salt according to (1), comprising the polypeptide or its salt according to (1).

(6) A compound or its salt that either promotes or inhibits the activity of the polypeptide or its salt according to (1), which is obtainable using the screening method according to (4) or the screening kit according to (5).

(7) A pharmaceutical composition comprising a compound or its salt that either promotes or inhibits the activity of the polypeptide or its salt according to (1), which is obtainable using the screening method according to (4) or the screening kit according to (5).

(8) A pharmaceutical comprising the polypeptide or its salt according to (1).

The present invention further relates to the following features.

(9) A polypeptide according to (1), wherein substantially the same amino acid sequence as one amino acid sequence selected among amino acid sequences represented by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15 possesses not less than about 50% homology (preferably not less than about 60% homology, and further preferably not less than about 70% homology, more preferably not less than about 80% homology, much more preferably not less than about 90% homology, and most preferably approximately 95% homology) to one amino acid sequence selected among the amino acid sequences represented by either SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15.

(10) A polypeptide according to (1), wherein the polypeptide contains ① substantially the same amino acid sequence as at least one amino acid sequence selected among amino acid sequences represented by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15, of which at least 1 or 2 (preferably approximately 1 to 30) amino acids are deleted; ② the amino acid sequence selected among the amino acid sequences shown by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15, to which at least 1 or 2 (preferably approximately

1 to 30) amino acids are added; ③ the amino acid sequence selected among the amino acid sequences represented by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15, in which at least 1 or 2 (preferably approximately 1 to 30) amino acids are substituted; or ④ the amino acid sequence containing a combination of these amino acid sequences.

(11) DNA encoding the said polypeptide according to (1).

(12) A recombinant vector which contains DNA encoding the said polypeptide according to (1).

Furthermore, the polypeptide of the present invention can be applied to fundamental studies including molecular weight marker, tissue marker, chromosome mapping, identification of genetic diseases, designing of primers and probes.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 shows the Western Blot analysis patterns indicating confirmation of secretion of each clone from animal cells, which was performed in Examples 16 – 20.

The culture supernatant equivalent to 1/16 well which was recovered from 6-well plate was subjected to development with use of 10-25% SDS-PAGE as the developing solvent, followed by Western Blot analysis with use of anti-FLAG antibody.

In this FIG., lane 1, lane 2, lane 3, lane 4 and lane 5 represent electrophoresis of the culture supernatant of COS7 cells expressing TGC-480, TGC-711, TGC-714, TGC-715 and TGC-623, respectively.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

The polypeptide (hereinafter sometimes merely referred to as the polypeptide of the present invention) comprising at least one amino acid sequence selected from SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15 of the present invention may be any polypeptide derived from any cells (e.g., liver cells, splenocytes, nerve cells, glial cells, β cells of pancreas, bone marrow cells, mesangial cells, Langerhans' cells, epidermic cells, epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts, fibrocytes, myocytes, fat cells, immune cells (e.g., macrophage, T cells, B cells, natural killer cells, mast cells, neutrophile, basophile, eosinophile, monocyte), megakaryocyte, synovial cells, chondrocytes, bone cells, osteoblasts, osteoclasts, mammary gland cells, interstitial cells, or the corresponding precursor cells, stem cells, or cancer cells, etc.), or any tissues where such cells are present, e.g., brain or any region of the brain (e.g., olfactory bulb, amygdaloid nucleus, basal ganglia, hippocampus, thalamus, hypothalamus, cerebral cortex, medulla oblongata, cerebellum), spinal cord, hypophysis, stomach, pancreas,

kidney, liver, gonad, thyroid, gall-bladder, bone marrow, adrenal gland, skin, muscle, lung, gastrointestinal tract (e.g., large intestine and small intestine), blood vessel, heart, thymus, spleen, submandibular gland, peripheral blood, prostate, testis, ovary, placenta, uterus, bone, cartilage, joint and skeletal muscle, etc. from human and other warm-blooded animals (e.g., guinea pigs, rats, mice, chicken, rabbits, swine, sheep, bovine, monkeys, etc.). The polypeptide may also be either a recombinant polypeptide or a synthetic polypeptide.

The polypeptide of the present invention comprises a signal peptide therein, permitting extracellular secretion of the said polypeptide efficiently.

The amino acid sequence which has substantially the same amino acid sequence as one amino acid sequence selected from SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15 includes an amino acid sequence having not less than about 50% homology, preferably not less than about 60% homology, and further preferably not less than about 70% homology, more preferably not less than about 80% homology, much more preferably not less than about 90% homology, and most preferably approximately 95% homology compared with that of one amino acid sequence selected among the amino acid sequences represented by either SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15.

The polypeptide which has substantially the same amino acid sequence as one amino acid sequence selected from SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15 of the present invention includes a polypeptide having substantially the same amino acid sequence as that of one amino acid sequence selected from above-stated SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15 and furthermore, having substantially the equivalent properties as those of the polypeptide having one amino acid sequence selected among SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15.

Examples of the substantially equivalent properties include an exertion of its activity in that the polypeptide is extracellularly secreted and works as a humoral factor, etc. The term "substantially equivalent" is used to mean that the nature of the properties is the same. Therefore, although it is preferred that the properties such as the secretory pattern and the solubility, etc. be equivalent (e.g., about 0.1- to 100-fold, preferably about 0.5- to 10-fold, more preferably 0.5- to 2-fold), quantitative factors such as a level of the properties, a molecular weight of the polypeptide, etc. may differ.

Specifically, examples of the said polypeptide include a polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 22nd amino acid to the 125th amino acid represented by SEQ ID NO:1; a polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 24th amino acid to the 121st amino acid represented by SEQ ID NO:2; a

polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 20th amino acid to the 223rd amino acid represented by SEQ ID NO:3; a polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 22nd amino acid to the 248th amino acid represented by SEQ ID NO:4; a polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 20th amino acid to the 173rd amino acid represented by SEQ ID NO:5; a polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 21st amino acid to the 261st amino acid represented by SEQ ID NO:6; a polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 31st amino acid to the 243rd amino acid represented by SEQ ID NO:7; a polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 19th amino acid to the 149th amino acid represented by SEQ ID NO:8; a polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 21st amino acid to the 136th amino acid represented by SEQ ID NO:9; a polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 23rd amino acid to the 123rd amino acid represented by SEQ ID NO:10; a polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 21st amino acid to the 163rd amino acid represented by SEQ ID NO:11; a polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 19th amino acid to the 301st amino acid represented by SEQ ID NO:12; a polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 27th amino acid to the 69th amino acid represented by SEQ ID NO:13; a polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 24th amino acid to the 69th amino acid represented by SEQ ID NO:14; and a polypeptide containing the amino acid sequence comprising the 27th amino acid to the 197th amino acid represented by SEQ ID NO:15.

More specifically, polypeptides containing the following amino acid sequence are included in this invention ;amino acid sequences represented by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15, wherein at least 1 or 2 amino acids (preferably approximately 1 to 30 amino acids, more preferably approximately 1 to 10 amino acids, most preferably several (1 to 5) amino acids) are deleted; amino acid sequences represented by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15, wherein at least 1 or 2 amino acids (preferably approximately 1 to 30 amino acids, more preferably approximately 1 to 10 amino acids, most preferably several (1 to 5) amino acids) are added; amino acid sequences represented by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15, wherein at least 1 or 2 amino acids (preferably approximately 1 to 30 amino acids, more preferably approximately 1 to 10 amino acids, most preferably several (1 to 5) amino acids) are inserted; amino acid sequences represented by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:15, wherein at least 1 or 2 amino acids (preferably approximately 1 to 30 amino acids, more preferably approximately 1 to 10 amino acids, most preferably several (1 to 5) amino acids) are substituted by other

amino acids; or combination of the above-cited amino acid sequences constituting a polypeptide including mutein.

As stated above, in the cases with the amino acid sequence being inserted, deleted or substituted, there is no specific limitation with regard to the position of insertion, deletion and substitution.

Throughout the present specification, the polypeptide is represented in accordance with the conventional way of describing peptides, that is, the N-terminus (amino terminus) at the left hand and the C-terminus (carboxyl terminus) at the right hand. In the polypeptides of the present invention including the polypeptide containing the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:1, the C-terminus is usually in the form of a carboxyl group (-COOH) or a carboxylate (-COO⁻) but may be in the form of an amide (-CONH₂) or an ester (-COOR).

Examples of the ester group shown by R include a C₁₋₆ alkyl group such as methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, etc.; a C₃₋₈ cycloalkyl group such as cyclopentyl, cyclohexyl, etc.; a C₆₋₁₂ aryl group such as phenyl, α -naphthyl, etc.; a C₇₋₁₄ aralkyl group such as a phenyl-C₁₋₂-alkyl group, e.g., benzyl, phenethyl, etc., or an α -naphthyl-C₁₋₂-alkyl group such as α -naphthylmethyl, etc.; and the like. In addition, pivaloyloxymethyl or the like, which is used widely as an ester for oral administration, may also be used.

Where the polypeptide of the present invention contains a carboxyl group (or a carboxylate) at a position other than the C-terminus, its amido derivative or ester derivative of the carboxyl group is also included within the peptide of the present invention. As the ester group in such cases, the ester of the above-stated C-terminus may be used.

Furthermore, examples of the polypeptide of the present invention include variants, wherein the amino group at the N-terminal amino acid residue (e.g., methionine residue) is protected with a protecting group (for example, a C₁₋₆ acyl group such as a C₁₋₆ alkanoyl group, e.g., formyl group, acetyl group, etc.); those wherein the N-terminal region is cleaved in vivo and the glutamyl residue thus formed is pyroglutaminated; those wherein a substituent (e.g., -OH, -SH, amino group, imidazole group, indole group, guanidino group, etc.) on the side chain of an amino acid in the molecule is protected with a suitable protecting group (e.g., a C₁₋₆ acyl group such as a C₁₋₆ alkanoyl group, e.g., formyl group, acetyl group, etc.), or conjugated proteins such as glycoproteins bound to sugar chains.

For the polypeptide or its salts of the present invention, salts with physiologically

acceptable acids (e.g., inorganic acids, organic acids) and bases (e.g., alkali metal salts) are used; particularly, physiologically acceptable acid addition salts are preferred. Examples of such salts include salts with, for example, inorganic acids (e.g., hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid); salts with organic acids (e.g., acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid) and the like.

The polypeptide or its salts of the present invention may be manufactured by a publicly known purification method from human or other mammalian cells or tissues described above, or by culturing a transformant comprising the DNA encoding the polypeptide of the present invention, as will be later described. Furthermore, the polypeptide or its salts may also be manufactured by the methods for synthesizing peptides, which will also be described hereinafter.

Where the polypeptide or its salts are manufactured from human or mammalian tissues or cells, human or mammalian tissues or cells are homogenized, then extracted with an acid or the like, and the extract can be isolated and purified by a combination of chromatography techniques such as reverse phase chromatography, ion exchange chromatography, and the like.

To synthesize the polypeptide or its salts, or its amides or salts thereof according to the present invention, commercially available resins that are used for peptide synthesis may be used. Examples of such resins include chloromethyl resin, hydroxymethyl resin, benzhydrylamine resin, aminomethyl resin, 4-benzyloxibenzylalcohol resin, 4-methylbenzhydrylamine resin, PAM resin, 4-hydroxymethylmethylphenylacetamidomethyl resin, polyacrylamide resin, 4-(2',4'-dimethoxyphenylhydroxymethyl)phenoxy resin, 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-aminoethyl)phenoxy resin, etc. Using these resins, amino acids in which α -amino groups and functional groups on the side chains appropriately are protected are condensed on the resin in the order of the sequence of the objective polypeptide according to various condensation methods publicly known. At the end of the reaction, the polypeptide is liberated from the resin and at the same time, the protecting groups are removed. Then, intramolecular disulfide bond-forming reaction is performed in a highly diluted solution to obtain the objective polypeptide or its amides.

For condensation of the protected amino acids described above, a variety of activation reagents for peptide synthesis can be used, and carbodiimides are

particularly preferable. Examples of such carbodiimides include DCC, N,N'-diisopropylcarbodiimide, N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, etc. For activation by these reagents, the protected amino acids in combination with a racemization inhibitor (e.g., HOBt, HOObt) are added directly to the resin, or the
 5 protected amino acids are previously activated in the form of symmetric acid anhydrides, HOBt esters or HOObt ester, followed by adding the thus activated protected amino acids to the resin.

Solvents suitable for use to activate the protected amino acids or condense with the resin may be chosen from solvents known to be usable for peptide condensation
 10 reactions. Examples of such solvents are acid amides such as N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide, N-methylpyrrolidone, etc.; halogenated hydrocarbons such as methylene chloride, chloroform, etc.; alcohols such as trifluoroethanol, etc.; sulfoxides such as dimethylsulfoxide, etc.; ethers such as pyridine, dioxane, tetrahydrofuran, etc.; nitriles such as acetonitrile, propionitrile,
 15 etc.; esters such as methyl acetate, ethyl acetate, etc.; and appropriate mixtures of these solvents. The reaction temperature is appropriately chosen from the range known to be applicable to peptide binding reactions and is usually selected in the range of approximately -20°C to 50°C . The activated amino acid derivatives are used generally in an excess of 1.5 to 4 times. The condensation is examined by a test using
 20 the ninhydrin reaction; when the condensation is insufficient, the condensation can be completed by repeating the condensation reaction without removal of the protecting groups. When the condensation is yet insufficient even after repeating the reaction, unreacted amino acids are acetylated with acetic anhydride or acetylimidazole, whereby influences on the subsequent reactions can be avoided.

25 Examples of the protecting groups used to protect the amino groups of the starting compounds include Z, Boc, t-pentyloxycarbonyl, isobornyloxycarbonyl, 4-methoxybenzyloxycarbonyl, Cl-Z, Br-Z, adamantyloxycarbonyl, trifluoroacetyl, phthaloyl, formyl, 2-nitrophenylsulphenyl, diphenylphosphinothioyl, Fmoc, etc.

A carboxyl group can be protected by, e.g., alkyl esterification (in the form of
 30 linear, branched or cyclic alkyl esters of the alkyl moiety such as methyl, ethyl, propyl, butyl, t-butyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl, cyclooctyl, 2-adamantyl, etc.), aralkyl esterification (e.g., esterification in the form of benzyl ester, 4-nitrobenzyl ester, 4-methoxybenzyl ester, 4-chlorobenzyl ester, benzhydryl ester, etc.), phenacyl esterification, benzyloxycarbonyl hydrazidation, t-butoxycarbonyl hydrazidation,
 35 tritylhydrazidation, or the like.

The hydroxyl group of serine can be protected through, for example, its esterification or etherification. Examples of groups appropriately used for the esterification include a lower (C_{1-6})alkanoyl group, such as acetyl group, an aroyl group such as benzoyl group, and a group derived from carbonic acid such as benzyloxycarbonyl group, ethoxycarbonyl group, etc. Examples of a group appropriately used for the etherification include benzyl group, tetrahydropyranyl group, t-butyl group, etc.

Examples of groups for protecting the phenolic hydroxyl group of tyrosine include Bzl, Cl_2 -Bzl, 2-nitrobenzyl, Br-Z, t-butyl, etc.

Examples of groups used to protect the imidazole moiety of histidine include Tos, 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl, DNP, benzyloxymethyl, Bum, Boc, Trt, Fmoc, etc.

Examples of the activated carboxyl groups in the starting compounds include the corresponding acid anhydrides, azides, activated esters (ester with alcohols (e.g., pentachlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, 2,4-dinitrophenol, cyanomethyl alcohol, p-nitrophenol, HONB, N-hydroxysuccinimide, N-hydroxyphthalimide, HOBt)). As the activated amino acids, in which the amino groups are activated in the starting material, the corresponding phosphoric amides are employed.

To eliminate (split off) the protecting groups, there are used catalytic reduction under hydrogen gas flow in the presence of a catalyst such as Pd-black or Pd-carbon; an acid treatment with anhydrous hydrogen fluoride, methanesulfonic acid, trifluoromethane-sulfonic acid or trifluoroacetic acid, or a mixture solution of these acids; a treatment with a base such as diisopropylethylamine, triethylamine, piperidine or piperazine; and reduction with sodium in liquid ammonia. The elimination of the protecting group by the acid treatment described above is carried out generally at a temperature of approximately -20°C to 40°C . In the acid treatment, it is efficient to add a cation scavenger such as anisole, phenol, thioanisole, m-cresol, p-cresol, dimethylsulfide, 1,4-butanedithiol or 1,2-ethanedithiol. Furthermore, 2,4-dinitrophenyl group known as the protecting group for the imidazole of histidine is removed by a treatment with thiophenol. Formyl group used as the protecting group of the indole of tryptophan is eliminated by the aforesaid acid treatment in the presence of 1,2-ethanedithiol or 1,4-butanedithiol, as well as by a treatment with an alkali such as a dilute sodium hydroxide solution and dilute ammonia.

Protection of functional groups that should not be involved in the reaction of the starting materials, protecting groups, elimination of the protecting groups and

activation of functional groups involved in the reaction may be appropriately selected from publicly known groups and publicly known means.

In another method for obtaining the amides of the polypeptide, for example, the α -carboxyl group of the carboxy terminal amino acid is first protected by amidation; the peptide (polypeptide) chain is then extended from the amino group side to a desired length. Thereafter, a polypeptide in which only the protecting group of the N-terminal α -amino group in the peptide chain has been eliminated from the polypeptide and a polypeptide in which only the protecting group of the C-terminal carboxyl group has been eliminated are separately prepared. The two polypeptides are condensed in a mixture of the solvents described above. The details of the condensation reaction are the same as described above. After the protected polypeptide obtained by the condensation is purified, all the protecting groups are eliminated by the method described above to give the desired crude polypeptide. This crude polypeptide is purified by various known purification means. Lyophilization of the major fraction gives the amide of the desired polypeptide.

To prepare the esterified polypeptide, for example, the α -carboxyl group of the carboxy terminal amino acid is condensed with a desired alcohol to prepare the amino acid ester, which is followed by procedure similar to the preparation of the amidated polypeptide above to give the ester form of the desired polypeptide.

The polypeptide or its salts in the present invention can be manufactured by publicly known methods for peptide synthesis. For the methods for peptide synthesis, for example, either solid phase synthesis or liquid phase synthesis may be used. That is, the partial peptide or amino acids that can construct the partial peptide of the present invention are condensed with the remaining part. Where the product contains protecting groups, these protecting groups are removed to give the desired peptide. Publicly known methods for condensation and elimination of the protecting groups are described in 1) – 5) below.

1) M. Bodanszky & M.A. Ondetti : Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)

2) Schroeder & Luebke : The Peptide, Academic Press, New York (1965)

3) Nobuo Izumiya, et al. : *Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken* (Basics and experiments of peptide synthesis), published by Maruzen Co. (1975)

4) Haruaki Yajima & Shunpei Sakakibara : *Seikagaku Jikken Koza* (Biochemical Experiment) 1, *Tanpakushitsu no Kagaku* (Chemistry of Proteins) IV, 205 (1977)

5) Haruaki Yajima, ed. : *Zoku Iyakuhin no Kaihatsu* (A sequel to Development of Pharmaceuticals), Vol. 14, Peptide Synthesis, published by Hirokawa Shoten

After completion of the reaction, the product may be purified and isolated by a combination of conventional purification methods such as solvent extraction, distillation, column chromatography, liquid chromatography and recrystallization to give the polypeptide of the present invention. When the polypeptide obtained by the above methods is in a free form, the peptide can be converted into an appropriate salt by a publicly known method or by modifications thereof ; when the polypeptide is obtained in a salt form, it can be converted into a free form by a publicly known method or by modifications thereof.

The DNA encoding the polypeptide of the present invention may be any DNAs so long as it contains the base sequence encoding the polypeptide of the present invention described above. Furthermore, the said DNA may be any of genomic DNA, cDNA derived from the cells and tissues described above, and synthetic DNA.

The vector to be used for the library may be any of bacteriophage, plasmid, cosmid and phagemid. The total RNA or mRNA fraction prepared from the cells and tissues described above can be directly amplified by reverse transcriptase polymerase chain reaction (hereinafter abbreviated as RT-PCR).

The DNA encoding the polypeptide of the present invention may be any DNA having at least one base sequence selected from SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:30 ; or the DNA having the base sequence hybridizable to at least one base sequence selected from SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:30 under highly stringent conditions, and encoding the polypeptide having the properties substantially equivalent to those of the peptide of the present invention (e.g., an immunogenicity), and further, the DNA encoding the polypeptide having substantially the same properties as those of the polypeptide of the present invention.

Specific examples of the said DNA include DNA containing at least one base sequence selected from SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:30, or the DNA having the base sequence hybridizable to at least one base sequence selected from SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:30 under highly stringent conditions, and encoding the polypeptide having the properties substantially equivalent to those of the peptide of the present invention (e.g., an immunogenicity) and further, the DNA encoding the polypeptide having substantially the same properties as those of the polypeptide of the present invention.

More specific examples of the said DNA include the DNA containing at least one base

sequence selected from SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:30, or the DNA having the base sequence hybridizable to at least one base sequence selected from SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:30 under highly stringent conditions, and encoding the polypeptide having the properties substantially equivalent to those of the peptide of the present invention (e.g., a secretory activity) and further, the DNA encoding the polypeptide having substantially the same properties as those of the polypeptide of the present invention.

Specific examples of the DNA hybridizable to at least one base sequence selected from SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:30 under highly stringent conditions include DNA containing approximately not less than 60% homology, preferably approximately not less than 70% homology, more preferably approximately not less than 80% homology, to at least one base sequence selected from SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:30.

More specifically, examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:16 ; examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:17 ; examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:3 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:18 ; examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:4 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:19 ; examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:5 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:20 ; examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:6 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:21 ; examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:7 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:22 ; examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:8 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:23 ; examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:9 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:24 ; examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:10 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:25 ; examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence

represented by SEQ ID NO:11 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:26 ; examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:12 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:27 ; examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:13 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:28 ; examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:14 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:29 ; examples of the DNA encoding the polypeptide containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:15 include DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO:30.

The hybridization can be carried out by publicly known methods or by modifications of these methods, for example, according to the method described in *Molecular Cloning*, 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press. 1989). A commercially available library may also be used according to the instructions of the attached manufacturer's protocol. Preferably, the hybridization can be carried out under highly stringent conditions.

The highly stringent conditions used herein are, for example, those in a sodium concentration at about 19 mM to about 40 mM, preferably about 19 mM to about 20 mM at a temperature of about 50°C to about 70°C, preferably about 60°C to about 65°C.

For cloning of the DNA that completely encodes the polypeptide of the present invention, the DNA may be either amplified by PCR using synthetic DNA primers containing a part of the base sequence of the polypeptide of the present invention and the template derived from tissues or cells expressing the polypeptide, or the DNA inserted into an appropriate vector can be selected by hybridization with a labeled DNA fragment or synthetic DNA that encodes a part or entire region of the polypeptide of the present invention, against a library derived from tissues and cells that express the polypeptide in question. The hybridization can be carried out, for example, according to the method described in *Molecular Cloning*, 2nd, (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press. 1989). The hybridization may also be performed using commercially available library in accordance with the protocol described in the attached instructions.

Substitution of the base sequence of the DNA can be conducted by PCR or publicly known methods such as the Gapped duplex method or the Kunkel method or

its modification by using a publicly known kit available as MutanTM-G or MutanTM-K (both manufactured by Takara Shuzo Co., Ltd.).

The cloned DNA encoding the polypeptide can be used as it is, depending upon purpose or, if desired, after digestion with a restriction enzyme or after addition of a linker thereto. The DNA may contain ATG as a translation initiation codon at the 5' end thereof and may further contain TAA, TGA or TAG as a translation termination codon at the 3' end thereof. These translation initiation and termination codons may also be added by using an appropriate synthetic DNA adapter.

The expression vector for the polypeptide of the present invention can be manufactured, for example, by (a) excising the desired DNA fragment from the DNA encoding the polypeptide of the present invention, and then (b) ligating the DNA fragment downstream a promoter in an appropriate expression vector.

Examples of the vector include plasmid derived from *E. coli* (e.g., pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), plasmids derived from *Bacillus subtilis* (e.g., pUB110, pTP5, pC194), plasmids derived from yeast (e.g., pSH19, pSH15), bacteriophages such as λ phage, etc., animal viruses such as retrovirus, vaccinia virus, baculovirus, , etc. as well as pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNAI/Neo, etc.

The promoter used in the present invention may be any promoter if it matches well with a host to be used for gene expression. In the case of using animal cells as the host, examples of the promoter include SR α promoter, SV40 promoter, LTR promoter, CMV promoter, HSV-TK promoter, etc.

Among them, CMV (cytomegalovirus) promoter or SR α promoter is preferably used. Where the host is bacteria of the genus *Escherichia*, preferred examples of the promoter include trp promoter, lac promoter, recA promoter, λ P_L promoter, lpp promoter, and T7 promoter, etc. In the case of using bacteria of the genus *Bacillus* as the host, preferred examples of the promoter are SPO1 promoter, SPO2 promoter and penP promoter. When yeast is used as the host, preferred examples of the promoter are PHO5 promoter, PGK promoter, GAP promoter and ADH promoter. When insect cells are used as the host, preferred examples of the promoter include polyhedrin promoter and P10 promoter, etc.

In addition to the foregoing examples, the expression vector may further optionally contain an enhancer, a splicing signal, a poly A addition signal, a selection marker, SV40 replication origin (hereinafter sometimes abbreviated as SV40ori) etc. Examples of the selection marker include dihydrofolate reductase (hereinafter sometimes abbreviated as dhfr) gene [methotrexate (MTX) resistance], ampicillin

resistant gene (hereinafter sometimes abbreviated as Amp^r), neomycin resistant gene (hereinafter sometimes abbreviated as Neo^r, G418 resistance), etc. In particular, when dhfr gene is used as the selection marker in dhfr gene deficient Chinese hamster cells, selection of the objective gene can also be made on thymidine free media.

5 If necessary and desired, a signal sequence that matches with a host is added to the N-terminus of the polypeptide of the present invention. Examples of the signal sequence that can be used are Pho A signal sequence, OmpA signal sequence, etc. in the case of using bacteria of the genus *Escherichia* as the host ; α -amylase signal sequence, subtilisin signal sequence, etc. in the case of using bacteria of the genus
10 *Bacillus* as the host ; MF α signal sequence, SUC2 signal sequence, etc. in the case of using yeast as the host ; and insulin signal sequence, α -interferon signal sequence, antibody molecule signal sequence, etc. in the case of using animal cells as the host, respectively.

Using the vector containing the DNA encoding the polypeptide of the present
15 invention thus constructed, transformants can be manufactured.

Examples of the host, which may be employed, are bacteria belonging to the genus *Escherichia*, bacteria belonging to the genus *Bacillus*, yeast, insect cells, insects and animal cells, etc.

Specific examples of the bacteria belonging to the genus *Escherichia* include
20 *Escherichia coli* K12 DH 1 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 60, 160 (1968)], JM103 [Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981)], JA221 [Journal of Molecular Biology, 120, 517 (1978)], HB101 [Journal of Molecular Biology, 41, 459 (1969)], C600 [Genetics, 39, 440 (1954)], etc.

Examples of the bacteria belonging to the genus *Bacillus* include *Bacillus subtilis*
25 MI114 [Gene, 24, 255 (1983)], 207 – 21 [Journal of Biochemistry, 95, 87 (1984)], etc.

Examples of yeast include *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R⁺, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, *Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913, NCYC2036, *Pichia pastoris* KM71, etc.

Examples of insect cells include, for the virus AcNPV, *Spodoptera frugiperda*
30 cells (Sf cells), MG1 cells derived from mid-intestine of *Trichoplusia ni*, High FiveTM cells derived from egg of *Trichoplusia ni*, cells derived from *Mamestra brassicae*, and cells derived from *Estigmena acrea*, etc. ; and for the virus BmNPV, *Bombyx mori* N cells (BmN cells), etc are used. Examples of the Sf cells which can be used are Sf9 cells (ATCC CRL711) and Sf21 cells [both cells are described in Vaughn, J.L. et al., In
35 Vivo, 13, 213 – 217 (1977)].

As the insect, for example, a larva of *Bombyx mori* can be used [Maeda, et al., *Nature*, 315, 592 (1985)].

Examples of animal cells include monkey cells COS7, Vero, Chinese hamster cells CHO (hereinafter referred to as CHO cells), dhfr gene deficient Chinese hamster
 5 cells CHO (hereinafter simply referred to as CHO (dhfr⁻) cells), mouse L cells, mouse AtT-20, mouse myeloma cells, rat GH3, human FL cells, etc.

Bacteria belonging to the genus *Escherichia* can be transformed, for example, by the method described in *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 2110 (1972) or *Gene*, 17, 107 (1982).

10 Bacteria belonging to the genus *Bacillus* can be transformed, for example, by the method described in *Molecular & General Genetics*, 168, 111 (1979).

Yeast can be transformed, for example, by the method described in *Methods in Enzymology*, 194, 182 – 187 (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 1929 (1978), etc.

15 Insect cells or insects can be transformed, for example, according to the method described in *Bio/Technology*, 6, 47 – 55 (1988), etc.

Animal cells can be transformed, for example, according to the method described in *Saibo Kogaku* (Cell Engineering), extra issue 8, *Shin Saibo Kogaku Jikken Protocol* (New Cell Engineering Experimental Protocol), 263 – 267 (1955), published by
 20 Shujunsha, or *Virology*, 52, 456 (1973).

Thus, the transformant transformed with the expression vector containing the DNA encoding the polypeptide can be obtained.

Where the host is bacteria belonging to the genus *Escherichia* or the genus *Bacillus*, the transformant can be appropriately incubated in a liquid medium which
 25 contains materials required for growth of the transformant such as carbon sources, nitrogen sources, inorganic materials, and so on. Examples of the carbon sources include glucose, dextrin, soluble starch, sucrose, etc. Examples of the nitrogen sources include inorganic or organic materials such as ammonium salts, nitrate salts, corn steep liquor, peptone, casein, meat extract, soybean cake, potato extract, etc.
 30 Examples of the inorganic materials are calcium chloride, sodium dihydrogenphosphate, magnesium chloride, etc. In addition, yeast extract, vitamins, growth promoting factors etc. may also be added to the medium. Preferably, pH of the medium is adjusted to about 5 to about 8.

A preferred example of the medium for incubation of the bacteria belonging to
 35 the genus *Escherichia* is M9 medium supplemented with glucose and Casamino acids

[Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431 – 433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (1972)]. If necessary and desired, a chemical such as 3 β -indolylacrylic acid can be added to the medium thereby to activate the promoter efficiently.

5 Where the bacteria belonging to the genus *Escherichia* are used as the host, the transformant is usually cultivated at about 15°C to about 43°C for about 3 hours to about 24 hours. If necessary and desired, the culture may be aerated or agitated.

10 Where the bacteria belonging to the genus *Bacillus* are used as the host, the transformant is cultivated generally at about 30°C to about 40°C for about 6 hours to about 24 hours. If necessary and desired, the culture may be aerated or agitated.

15 Where yeast is used as the host, the transformant is cultivated, for example, in Burkholder's minimal medium [Bostian, K.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 4505 (1980)] or in SD medium supplemented with 0.5% Casamino acids [Bitter, G.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 5330 (1984)]. Preferably, pH of the medium is adjusted to about 5 to about 8. In general, the transformant is cultivated at about 20°C to about 35°C for about 24 hours to about 72 hours. If necessary and desired, the culture can be aerated or agitated.

20 Where insect cells or insects are used as the host, the transformant is cultivated in, for example, Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)] to which an appropriate additive such as immobilized 10% bovine serum is added. Preferably, pH of the medium is adjusted to about 6.2 to about 6.4. Normally, the transformant is cultivated at about 27°C for about 3 days to about 5 days and, if necessary and desired, the culture can be aerated or agitated.

25 Where animal cells are employed as the host, the transformant is cultivated in, for example, MEM medium containing about 5% to about 20% fetal bovine serum [Science, 122, 501 (1952)], DMEM medium [Virology, 8, 396 (1959)], RPMI 1640 medium [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)], 199 medium [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)], etc. Preferably, pH of the medium is adjusted to about 6 to about 8. The transformant is usually cultivated at about 30°C to about 40°C for about 15 hours to about 60 hours and, if necessary and desired, the culture can be aerated or agitated.

As described above, the polypeptide of the present invention can be produced within the cell, in the cell membrane or outside the cell of the transformant.

35 The polypeptide of the present invention can be separated and purified from the culture described above by the following procedures.

When the polypeptide of the present invention is extracted from the culture or cells, after cultivation the transformants or cells are collected by a publicly known method and suspended in an appropriate buffer. The transformants or cells are then disrupted by publicly known methods such as ultrasonication, a treatment with lysozyme and/or freeze-thaw cycling, followed by centrifugation, filtration, etc. Thus, the crude extract of the polypeptide of the present invention can be obtained. The buffer used for the procedures may contain a protein modifier such as urea or guanidine hydrochloride, or a surfactant such as Triton X-100TM, etc. When the polypeptide is secreted in the culture, after completion of the cultivation the supernatant can be separated from the transformants or cells to collect the supernatant by a publicly known method.

The polypeptide contained in the supernatant or the extract thus obtained can be purified by appropriately combining the publicly known methods for separation and purification. Such publicly known methods for separation and purification include a method utilizing difference in solubility such as salting out, solvent precipitation, etc.; a method utilizing mainly difference in molecular weight such as dialysis, ultrafiltration, gel filtration, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, etc.; a method utilizing difference in electric charge such as ion exchange chromatography, etc.; a method utilizing difference in specific affinity such as affinity chromatography, etc.; a method utilizing difference in hydrophobicity such as reverse phase high performance liquid chromatography, etc.; a method utilizing difference in isoelectric point such as isoelectrofocusing electrophoresis; and the like.

When the polypeptide thus obtained is in a free form, it can be converted into the salt by publicly known methods or modifications thereof. On the other hand, when the polypeptide is obtained in the form of a salt, it can be converted into the free form or in the form of a different salt by publicly known methods or modifications thereof.

The polypeptide produced by the recombinant can be treated, prior to or after the purification, with an appropriate protein modifying enzyme so that the polypeptide can be appropriately modified to partially remove a polypeptide. Examples of the protein-modifying enzyme include trypsin, chymotrypsin, arginyl endopeptidase, protein kinase, glycosidase or the like.

The presence of the thus produced polypeptide of the present invention or salts thereof can be determined by an enzyme immunoassay or Western blotting, or the like using a specific antibody.

Antibodies to the polypeptide of the present invention, or salts thereof may be

any of polyclonal antibodies and monoclonal antibodies, as long as they are capable of recognizing the polypeptide of the present invention or its salts thereof.

The antibodies to the polypeptide of the present invention, or salts thereof may be manufactured by publicly known methods for manufacturing antibodies or antisera, using as antigens of the polypeptide of the present invention.

[Preparation of monoclonal antibody]

(a) Preparation of monoclonal antibody-producing cells

The polypeptide of the present invention is administered to warm-blooded animals either solely or together with carriers or diluents to the site where the production of antibody is possible by the administration. In order to potentiate the antibody productivity upon the administration, complete Freund's adjuvants or incomplete Freund's adjuvants may be administered. The administration is usually carried out once in every two to 6 weeks and 2 to 10 times in total. Examples of the applicable warm-blooded animals are monkeys, rabbits, dogs, guinea pigs, mice, rats, sheep, goats and chicken, with mice and rats being preferred.

In preparation of monoclonal antibody-producing cells, warm-blooded animals, e.g. mice, immunized with an antigen wherein the antibody titer is noted are selected, then the spleen or lymph node is collected after 2 to 5 days from the final immunization and antibody-producing cells contained therein are fused with myeloma cells to give monoclonal antibody-producing hybridomas. Measurement of the antibody titer in antisera may be made, for example, by reacting a labeled form of the polypeptide which will be described later, with the antiserum followed by assaying the binding activity of the labeling agent bound to the antibody. The fusion may be operated, for example, by the known Koehler and Milstein method [Nature, 256, 495, 1975]. Examples of the fusion accelerator are polyethylene glycol (PEG), Sendai virus, etc., of which PEG is preferably employed.

Examples of the myeloma cells are NS-1, P3U1, SP2/0 and AP-1, etc., which are the myeloma cells derived from warm-blooded animals. In particular, P3U1 is preferably employed. A preferred ratio of the count of the antibody-producing cells used (spleen cells) to the count of myeloma cells is within a range of approximately 1:1 to 20:1. When PEG (preferably, PEG 1000 to PEG 6000) is added in a concentration of approximately 10 to 80% followed by incubating at about 20 to about 40°C, preferably at about 30 to about 37°C for about 1 to about 10 minutes, an efficient cell fusion can be carried out.

Various methods can be used for screening of a monoclonal antibody-producing hybridoma. Examples of such methods include a method which comprises adding the supernatant of hybridoma to a solid phase (e.g., microplate) adsorbed with the polypeptide as an antigen directly or together with a carrier, adding
5 anti-immunoglobulin antibody (when mouse cells are used for the cell fusion, anti-mouse immunoglobulin antibody is used) labeled with a radioactive substance or an enzyme, or Protein A and detecting the monoclonal antibody bound to the solid phase, and a method which comprises adding the supernatant of hybridoma to a solid
10 adsorbed with an anti-immunoglobulin antibody or Protein A, adding the polypeptide labeled with a radioactive substance or an enzyme and detecting the monoclonal antibody bound to the solid phase.

The monoclonal antibody can be selected by publicly known methods or by modifications of these methods. In general, the selection can be effected in a medium for animal cells supplemented with HAT (hypoxanthine, aminopterin and thymidine).
15 Any selection and growth medium can be employed as far as the hybridoma can grow therein. For example, RPMI 1640 medium containing 1% to 20%, preferably 10% to 20% fetal bovine serum, GIT medium (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) containing 1% to 10% fetal bovine serum, a serum free medium for cultivation of a hybridoma (SFM-101, Nissui Seiyakku Co., Ltd.) and the like can be used for the
20 selection and growth medium. The cultivation is carried out generally at 20°C to 40°C, preferably at about 37°C, for 5 days to 3 weeks, preferably 1 to 2 weeks. The cultivation can be conducted normally in 5% CO₂. The antibody titer of the culture supernatant of hybridomas can be determined as in the assay for the antibody titer in antisera described above.

25 (b) Purification of monoclonal antibody

Separation and purification of a monoclonal antibody can be carried out by publicly known methods, for example, methods applied to separation and purification of immunoglobulins [e.g., salting-out, alcohol precipitation, isoelectric point
30 precipitation, electrophoresis, adsorption and desorption with ion exchangers (e.g., DEAE), ultracentrifugation, gel filtration, or a specific purification method which comprises collecting only an antibody with an activated adsorbent such as antigen-binding solid phase, Protein A, Protein G, etc. and dissociating the binding to obtain the antibody].

[Preparation of polyclonal antibody]

The polyclonal antibody of the present invention can be manufactured by publicly known methods or modifications thereof. For example, by an immunogen (polypeptide antigen) solely, or by preparing a complex of the immunogen and a carrier protein and using it, a warm-blooded animal is immunized in a manner similar to the method described above for the manufacture of monoclonal antibodies. The product containing the antibody to the polypeptide of the present invention or its salts is collected from the immunized animal followed by separation and purification of the antibody.

In the complex of an immunogen and a carrier protein used to immunize a warm-blooded animal, the type of carrier protein and the mixing ratio of a carrier to hapten may be any type and in any ratio, as long as the antibody is efficiently produced to the hapten immunized by crosslinking to the carrier. For example, bovine serum albumin, bovine thyroglobulins, hemocyanin, etc. is coupled to hapten in a carrier-to-hapten weight ratio of approximately 0.1 to 20, preferably about 1 to about 5.

A variety of condensing agents can be used for the coupling of a carrier to hapten. Glutaraldehyde, carbodiimide, maleimide activated ester, activated ester reagents containing thiol group or dithiopyridyl group, etc. are used for the coupling.

The condensation product is administered to warm-blooded animals either solely or together with carriers or diluents to the site in which the antibody can be produced by the administration. In order to potentiate the antibody productivity upon the administration, complete Freund's adjuvant or incomplete Freund's adjuvant may be administered. The administration is usually made once approximately in every 2 to 6 weeks and about 3 to about 10 times in total.

The polyclonal antibody can be collected from the blood, ascites, etc., preferably from the blood of warm-blooded animals immunized by the method described above.

The polyclonal antibody titer in antiserum can be assayed by the same procedure as that for the determination of antibody titer in the anti-serum described above. The separation and purification of the polyclonal antibody can be carried out, following the method for the separation and purification of immunoglobulins performed as applied to the separation and purification of monoclonal antibodies described hereinabove.

By using the polypeptide of the present invention, human antibody can be prepared in accordance with the method described in Nat Biotechnol. 14, 845 – 851 (1996), Nat Genet 15, 146 – 156 (1997) and PNAS 97(2), 722 – 727 (2000) and the like.

The antisense-DNA containing complementary or substantially complementary base sequence to the DNA encoding the polypeptide of the present invention (in the explanation of antisense-DNA hereinafter, these DNAs are referred to as DNAs of the present invention) may be any antisense-DNA, as far as the DNA contains
5 complementary or substantially complementary base sequence to DNA of the present invention, and further possesses the activity to inhibit expression of the said DNA.

Examples of the substantially complementary base sequence to DNA of the present invention include the base sequences in which all the base sequences are homologous to the complementary base sequence to DNA of the present invention
10 (e.g., complementary chain of DNA of the present invention), or partial base sequence shows homology by more than approximately 70%, preferably more than approximately 80%, more preferably more than approximately 90%, most preferably more than approximately 95%. In particular, the antisense-DNA is preferable, as long as the complementary chain to the base sequence of the part encoding the N-terminus
15 of the polypeptide of the present invention (e.g., base sequence of the initiation codon area, etc.) among the total base sequence of complementary chain of DNA of the present invention, shows homology by more than approximately 70%, preferably more than approximately 80%, more preferably more than approximately 90% and most preferably approximately 95%. These antisense-DNAs can be manufactured by using
20 the DNA synthesizer, which is publicly known.

Due to possessing signal peptide, the polypeptide of the present invention can be secreted efficiently from cells and then exerts important physiological activities as the humoral factor in signal transduction and self-defense.

Hereinafter, explanation is given on the use of the polypeptide or its salts of the present invention (hereinafter, sometimes referred to as the polypeptide of the present invention), DNA encoding the polypeptide of the present invention (hereinafter, sometimes referred to as the DNA of the present invention), antibodies to the polypeptide or its salts of the present invention (hereinafter, sometimes referred to as antibodies of the present invention) and antisense-DNA.
25

(1) The polypeptide of the present invention, expressing tissue-specifically, can be used as the tissue marker. In other words, the polypeptide of the present invention is useful as the marker for detecting differentiation of tissues, conditions of diseases, and metastasis of cancer. In addition, it can be employed for fractionation of the corresponding receptor, ligand and the binding protein. Furthermore, the polypeptide
30 of the present invention can be used to investigate biological activities in the form of a
35

panel for the publicly known high-through-put screening. Through chromosome mapping, the polypeptide of the present invention can be utilized in studies of genetic diseases.

(2) Prophylactic/therapeutic drugs for various diseases associated with the polypeptide of the present invention

The polypeptide of the present invention exists as the humoral factor in the living body. Therefore, where abnormalities occur in the polypeptide of the present invention or the DNA of the present invention, or they are deficient, or the expressed amount is abnormally decreased or elevated, various diseases, for example, cancer, immunological diseases, respiratory tract diseases, digestive tract diseases, cardiovascular diseases, endocrinological diseases, infections, nervous system diseases and psychological diseases, etc. manifest.

Therefore, the polypeptide and the like of the present invention and the DNA of the present invention can be used as prophylactic/therapeutic agents for various diseases including cancer, immunological diseases, respiratory tract diseases, digestive tract diseases, cardiovascular diseases, endocrinological diseases, infections, nervous system diseases and psychological diseases, etc.

For example, when a patient suffers from inadequate transmission of information in cells, or lack of normal achievement due to decrease or defect of the polypeptide of the present invention in the living body, the intrinsic role of the polypeptide of the present invention, or the like can be adequately or normally expressed in the said patient, through (a) administration of the DNA of the present invention to the said patient, thereby leading to expression of the polypeptide of the present invention and the like in the living body, (b) expression of the polypeptide of the present invention and the like in the cells into which the DNA of the present invention is inserted, followed by transplantation of the cells in question to the patient, or (c) administration of the polypeptide of the present invention and the like to the patient in question.

When the DNA of the present invention is used as the prophylactic/therapeutic agents described above, the DNA itself is administered ; alternatively, the DNA is inserted into an appropriate vector such as retrovirus vector, adenovirus vector, adenovirus-associated virus vector, etc. and then administered to humans or warm-blooded animals in a conventional manner. The DNA of the present invention may also be administered as naked DNA, or formulations containing physiologically acceptable carriers such as adjuvants to assist its uptake by gene gun or through a catheter such as a catheter with a hydrogel.

When the polypeptide of the present invention is used as the prophylactic/therapeutic agents, purified polypeptide with purity of at least 90%, preferably more than 95%, more preferably more than 98%, most preferably more than 99% shall be preferably used.

5 Examples of the formulations for the polypeptide of the present invention include , if necessary and desired, sugar-coated tablets, capsules, elixirs and microcapsules for oral usage, or parenterally in the form of injectable preparations such as a sterile solution and a suspension in water or with other pharmaceutically acceptable liquid. These preparations can be manufactured by mixing the polypeptide
10 of the present invention with physiologically acceptable carrier, a flavoring agent, an excipient, a vehicle, an antiseptic agent, a stabilizer, a binder, etc. in a unit dosage form required in a generally accepted manner that is applied to making pharmaceutical preparations. The effective component in the preparation is controlled in such a dose that an appropriate dose is obtained within the specified range given.

15 Additives miscible with tablets, capsules, etc. include a binder such as gelatin, corn starch, tragacanth and gum Arabic, an excipient such as crystalline cellulose, a swelling agent such as corn starch, gelatin and alginic acid, a lubricant such as magnesium stearate, a sweetening agent such as sucrose, lactose and saccharin, and a flavoring agent such as peppermint, akamono oil and cherry. When the unit dosage is
20 in the form of capsules, liquid carriers such as oils and fats may further be used together with additives described above. A sterile composition for injection may be formulated by conventional procedures used to make pharmaceutical compositions, e.g., by dissolving or suspending the active ingredients in a vehicle such as water for injection with a naturally occurring vegetable oil such as sesame oil and coconut oil,
25 etc. to prepare the pharmaceutical composition.

 Examples of an aqueous medium for injection include physiological saline and an isotonic solution containing glucose and other auxiliary agents (e.g., D-sorbitol, D-mannitol, sodium chloride, etc.) and may be used in combination with an appropriate dissolution aid such as an alcohol (e.g., ethanol or the like), a polyalcohol
30 (e.g., propylene glycol and polyethylene glycol), a nonionic surfactant (e.g., polysorbate 80TH, HCO-50 or the like), etc. Examples of the oily medium include sesame oil and and soybean oil, which may also be used in combination with a dissolution aid such as benzyl benzoate and benzyl alcohol. The prophylactic/therapeutic agent described above may further be formulated with a
35 buffer (e.g., phosphate buffer, sodium acetate buffer, etc.), a soothing agent (e.g.,

benzalkonium chloride, procaine hydrochloride, etc.), a stabilizer (e.g., human serum albumin, polyethylene glycol, etc.), a preservative (e.g., benzyl alcohol, phenol, etc.), an antioxidant, etc. The thus-prepared solution for injection is normally filled in an appropriate ampoule.

5 The vector to which the DNA of the present invention is inserted may also be formulated in the similar manner as described above, and the resultant formulation is usually used parenterally.

10 Since the thus obtained pharmaceutical preparation is safe and low toxic, the preparation can be administered to humans or animals (e.g., rats, mice, guinea pigs, rabbits, birds, sheep, swine, bovine, horses, cats, dogs, monkeys, etc.).

15 The dose of the polypeptide of the present invention or the like varies depending on diseases to be treated, subjects to be administered, and routes for administration, etc. ; when the polypeptide of the present invention or the like is orally administered for the purpose of treatment of immunological diseases, the dose to an adult (as 60 kg body weight) is normally about 1mg to about 1000 mg, preferably about 10 mg to about 500 mg, more preferably about 10 mg to about 200 mg per day. In parenteral administration, the single dose varies depending on subjects to be administered, target diseases, etc. but it is advantageous, e.g., for treatment of immunological diseases of the adult patient (as 60 kg body weight), to inject the polypeptide in question locally to
20 the lesion in a daily dose of about 1 mg to 1000 mg, preferably about 1 mg to about 200 mg, more preferably about 10 mg to about 100 mg. For other animal species, the corresponding dose as converted per 60 kg body weight can be administered.

(2) Screening of the candidate compounds as drugs to be used for diseases

25 Since the polypeptide of the present invention or the like exists as humoral factors in the living body, compounds or their salts to promote functions of the polypeptide of the present invention, etc. can be used as prophylactic/therapeutic drugs for diseases, for example, cancer, immunological diseases, respiratory tract diseases, digestive tract diseases, cardiovascular diseases, endocrinological diseases, infections,
30 nervous system diseases and psychological diseases, etc.

On the other hand, compounds or their salts to inhibit functions of the polypeptide of the present invention, etc. can be used as prophylactic/therapeutic drugs for diseases attributed to overproduction of the polypeptide of the present invention or the like.

35 Thus, the polypeptide of the present invention, etc. is useful as the reagent for

screening of the compounds or their salts which promote or inhibit the functions of the polypeptide of the present invention, etc.

That is, the present invention, provides methods of screening compounds or their salts (hereinafter, sometimes referred to as the stimulant) that promote functions of the polypeptide of the present invention or its salts, or compounds or their salts (hereinafter, sometimes referred to as the inhibitor) that inhibit functions of the polypeptide of the present invention or its salts, characterized by using the polypeptide of the present invention or its salts.

The screening kit of the present invention contains the polypeptide of the present invention or its salts therein.

Examples of the compounds or their salts to be obtained by the screening methods or the screening kit of the present invention include compounds selected among peptides, proteins, non-peptide compounds, synthetic compounds, fermentation products, cell extracts, plant extracts, and animal tissue extracts and plasma, etc and these compounds either promote or inhibit functions of the polypeptide of the present invention or the like.

For the salts of these compounds, similar ones as the salts of the afore-mentioned polypeptide of the present invention are used.

When the compounds thus obtained with use of the screening method or the screening kit are used as the prophylactic/therapeutic agents, they can be processed according to the conventional methods. For example, in the similar manners to be employed for drugs containing the afore-mentioned polypeptide of the present invention, tablets, capsules, elixirs, microcapsules and aseptic solution, and suspensions, etc. can be prepared.

Since the thus obtained pharmaceutical preparation is safe and low toxic, the preparation can be administered to humans or warm-blooded animals (e.g., rats, mice, rabbits, sheep, swine, bovine, horses, birds, cats, dogs, monkeys, etc.).

The dose of the polypeptide of the present invention or its salts varies depending on activity, target diseases, subjects to be administered, and routes for administration, etc. ; when a compound which promotes the functions of the polypeptide of the present invention or the like is orally administered for the purpose of treatment of inflammatory diseases, the dose to an adult (as 60 kg body weight) is normally about 0.1mg to about 100 mg, preferably about 1.0 mg to about 50 mg, more preferably about 1.0 mg to about 20 mg per day. In parenteral administration, the single dose of the said compound varies depending on subject to be administered, target diseases, etc.

but it is advantageous, e.g., for treatment of inflammatory diseases or immunological diseases of the adult patient (as 60 kg body weight), to inject intravenously the compound to promote functions of the polypeptide of the present invention, etc. in a daily dose of about 0.01 mg to 30 mg, preferably about 0.1 mg to about 20 mg, more preferably about 0.1 mg to about 10 mg. For other animal species, the corresponding dose as converted per 60 kg body weight can be administered.

On the other hand, when a compound which inhibits the functions of the polypeptide of the present invention or the like is orally administered, the dose to an adult (as 60 kg body weight) is normally about 0.1mg to about 100 mg, preferably about 1.0 mg to about 50 mg, more preferably about 1.0 mg to about 20 mg per day. In parenteral administration, the single dose of the said compound varies depending on subject to be administered, target diseases, etc. but it is advantageous, e.g., in case of administration of the compound to promote functions of the polypeptide of the present invention, etc. to an adult (as 60 kg body weight), to administer by intravenous injection at a daily dose of about 0.01 mg to 30 mg, preferably about 0.1 mg to about 20 mg, more preferably about 0.1 mg to about 10 mg. For other animal species, the corresponding dose as converted per 60 kg body weight can be administered.

(3) Quantification of the polypeptide or its salts of the present invention

The antibodies to the polypeptide of the present invention, etc. (hereinafter, sometimes referred to as the antibody of the present invention) are capable of specifically recognizing the polypeptide of the present invention, etc. Therefore, the antibodies can be used to quantify the polypeptide of the present invention, etc. in a test fluid, especially for quantification by the sandwich immunoassay.

That is, the present invention provides, for example, the following quantification methods:

(i) a method of quantifying the polypeptide of the present invention and the like in a test fluid, which comprises competitively reacting the antibody of the present invention with the test fluid and a labeled form of the polypeptide of the present invention, and measuring the ratio of the labeled polypeptide of the present invention and the like bound to the antibody; and

(ii) a method of quantifying the polypeptide of the present invention and the like in a test fluid, which comprises reacting the test fluid with the antibody of the present invention immobilized on a carrier and a labeled form of the antibody of the present invention simultaneously or sequentially, and measuring the activity of the label on

the immobilized carrier.

Using monoclonal antibodies to the polypeptide of the present invention (hereinafter sometimes referred to as the monoclonal antibodies of the present invention), the polypeptide of the present invention can be assayed and also detected
5 by tissue staining or the like. For this purpose, an antibody molecule itself may be used, or F(ab')₂, Fab' or Fab fractions of the antibody molecule may also be used.

Assay methods using antibodies to the polypeptide of the present invention are not particularly limited. Any assay method can be used, so long as the amount of antibody, antigen, or antibody-antigen complex corresponding to the amount of antigen
10 (e.g., the amount of the polypeptide) in the test fluid can be detected by chemical or physical means and the amount of the antigen can be calculated from a standard curve prepared from standard solutions containing known amounts of the antigen. For example, nephrometry, competitive methods, immunometric method, and sandwich method are appropriately used, with the sandwich method described below being most
15 preferable in terms of sensitivity and specificity.

As the labeling agent for the methods using labeled substances, there are employed, for example, radioisotopes, enzymes, fluorescent substances, luminescent substances, etc. For the radioisotope, for example, [¹²⁵I], [¹³¹I], [³H] and [¹⁴C] are used. As the enzyme described above, stable enzymes with high specific activity are
20 preferred ; for example, β -galactosidase, β -glucosidase, alkaline phosphatase, peroxidase, malate dehydrogenase and the like are used. Examples of the fluorescent substance used are fluorescamine and fluorescein isothiocyanate. For the luminescent substance, for example, luminol, luminol derivatives, luciferin, and lucigenin are used. Furthermore, the biotin-avidin system may be used for binding antibody or antigen to
25 the label.

For immobilization of antigen or antibody, physical adsorption may be used. Chemical binding methods conventionally used for insolubilization or immobilization of polypeptides or enzymes may also be used. For the carrier, for example, insoluble polysaccharides such as agarose, dextran, cellulose, etc. ; synthetic resin such as
30 polystyrene, polyacrylamide, silicon, etc., and glass or the like are used.

In the sandwich method, the immobilized monoclonal antibody of the present invention is reacted with a test fluid (primary reaction), then with the labeled monoclonal antibody of the present invention (secondary reaction), and the activity of the label on the immobilizing carrier is measured, whereby the amount of the
35 polypeptide of the present invention in the test fluid can be quantified. The order of

the primary and secondary reactions may be reversed, and the reactions may be performed simultaneously or with an interval. The methods of labeling and immobilization can be performed by the methods described above. In the immunoassay by the sandwich method, the antibody used for immobilized or labeled
5 antibodies is not necessarily one species, but a mixture of two or more species of antibody may be used to increase the measurement sensitivity.

In the methods of assaying the polypeptide of the present invention and the like by the sandwich method, antibodies that bind to different sites of the polypeptide of the present invention are preferably used. That is, in the antibodies used for the primary
10 and secondary reactions, for example, when the antibody used in the secondary reaction recognizes the C-terminal region of the polypeptide of the present invention, it is preferable to use the antibody recognizing the region other than the C-terminal region for the primary reaction, e.g., the antibody recognizing the N-terminal region.

The monoclonal antibodies of the present invention can be used for the assay
15 systems other than the sandwich method, for example, competitive method, immunometric method, nephrometry, etc.

In the competitive method, antigen in a test fluid and the labeled antigen are competitively reacted with antibody, and the unreacted labeled antigen (F) and the labeled antigen bound to the antibody (B) are separated (B/F separation). The amount
20 of the label in B or F is measured, and the amount of the antigen in the test fluid is quantified. This reaction method includes a liquid phase method using a soluble antibody as an antibody, polyethylene glycol for B/F separation and a secondary antibody to the soluble antibody, and an immobilized method either using an immobilized antibody as the primary antibody, or using a soluble antibody as the
25 primary antibody and immobilized antibody as the secondary antibody.

In the immunometric method, antigen in a test fluid and immobilized antigen are competitively reacted with a definite amount of labeled antibody; the immobilized phase is separated from the liquid phase, or antigen in a test fluid and an excess amount of labeled antibody are reacted; immobilized antigen is then added to bind the
30 unreacted labeled antibody to the immobilized phase, and the immobilized phase is separated from the liquid phase. Then, the amount of the label in either phase is measured to quantify the antigen in the test fluid.

In the nephrometry, insoluble precipitate produced after the antigen-antibody reaction in gel or solution is quantified. When the amount of antigen in the test fluid
35 is small and only a small amount of precipitate is obtained, laser nephrometry using

scattering of laser is advantageously employed.

For applying these immunological methods to the measurement methods of the present invention, any particular conditions or procedures are not required. Systems for measuring the polypeptide of the present invention are constructed by adding the usual technical consideration in the art to the conventional conditions and procedures. For the details of these general technical means, reference can be made to the following reviews and texts.

For example, followings can be referred to : Hiroshi Irie, ed. "Radioimmunoassay" (Kodansha, published in 1974), Hiroshi Irie, ed. "Sequel to the Radioimmunoassay" (Kodansha, published in 1979), Eiji Ishikawa, et al. ed. "Enzyme immunoassay" (Igakushoin, published in 1978), Eiji Ishikawa, et al. ed. "Immunoenzyme assay" (2nd ed.) (Igakushoin published in 1982), Eiji Ishikawa, et al. ed. "Immunoenzyme assay" (3rd ed.) (Igakushoin, published in 1987), Methods in ENZYMOLOGY, Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A)), *ibid.*, Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B)), *ibid.*, Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C)), *ibid.*, Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays)), *ibid.*, Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), *ibid.*, Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (all published by Academic Press Publishing).

As described above, the polypeptide of the present invention or the like can be quantified with high sensitivity, using the antibodies of the present invention.

When the concentration of the polypeptide of the present invention is found to be reduced by means of quantifying the polypeptide of the present invention or the like in vivo using the antibodies of the present invention, diagnosis can be made on various diseases, for example, cancer, immunological diseases, respiratory tract diseases, digestive tract diseases, cardiovascular diseases, endocrinological diseases, infections, nervous system diseases and psychological diseases, etc., or on highly predisposing conditions leading to onset in future.

The antibodies of the present invention can also be used for specifically detecting the polypeptide of the present invention existing in test samples such as body fluids or tissues. The antibodies may also be used for preparation of antibody columns for purification of the polypeptide of the present invention, for detection of the polypeptide of the present invention in each fraction upon purification, and for analysis of the behavior of the polypeptide of the present invention in the test cells.

(4) Gene diagnostic agent

By using the DNA of the present invention as a probe, an abnormality (gene abnormality) of the DNA or mRNA encoding the polypeptide of the present invention in humans or warm-blooded animals (e.g., rats, mice, guinea pigs, rabbits, birds, sheep, swine, bovine, horses, cats, dogs, and monkeys etc.) can be detected. Therefore, the DNA of the present invention is useful as a gene diagnostic agent for the damage against the DNA or mRNA, its mutation, or its decreased expression, or increased expression or overexpression of the DNA or mRNA.

The gene diagnosis described above using the DNA of the present invention can be performed by, for example, the publicly known Northern hybridization assay or the PCR-SSCP assay [Genomics, 5, 874 – 879 (1989) ; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86, 2766 – 2770 (1989)].

For example, when decreased expression, and mutation of DNA are detected by Northern hybridization assay and PCR-SSCP assay, respectively, diagnosis can be made on higher morbidity of diseases including, for example, cancer, immunological diseases, respiratory tract diseases, digestive tract diseases, cardiovascular diseases, endocrinological diseases, infections, nervous system diseases and psychological diseases, etc.

(5) Drugs containing antisense-DNA

The antisense-DNA can complementarily bind to the DNA of the present invention, thereby inhibiting expression of the DNA in question. Therefore, since the antisense-DNA can inhibit functions of the polypeptide of the present invention, etc. and the DNA of the present invention in vivo, for example, the antisense-DNA can be used as a prophylactic/ therapeutic agent for diseases due to overexpression of the polypeptide of the present invention or the like.

When the above-cited antisense-DNA is employed as a prophylactic/therapeutic agent as described above, the same procedures as those employed for a prophylactic/therapeutic agent containing the DNA of the present invention as stated above for various diseases can be applied..

For example, when the antisense-DNA of the present invention is used as the prophylactic/therapeutic agents described above, the antisense-DNA itself is administered ; alternatively, the antisense-DNA is inserted into an appropriate vector such as retrovirus vector, adenovirus vector, adenovirus-associated virus vector, etc.

and then administered in a conventional manner. The antisense-DNA of the present invention may also be administered as naked antisense-DNA, or formulations containing physiologically acceptable carriers such as adjuvants to assist its uptake by gene gun or through a catheter such as a catheter with a hydrogel.

Furthermore, the antisense-DNA can be used as a diagnostic oligonucleotide probe to investigate presence and/or expression of the DNA of the present invention in tissues and cells.

(6) Pharmaceutical components containing the antibody of the present invention

The antibody of the present invention possessing neutralizing effect against the activity of the polypeptide of the present invention etc. can be used as a prophylactic/therapeutic agent for diseases due to overexpression of the polypeptide of the present invention or the like.

The prophylactic/therapeutic agent containing the antibody of the present invention for the above stated diseases can be used orally in the form of liquid preparation, or parenterally as a component of appropriate preparations, to humans or mammals (e.g., rats, rabbits, sheep, swine, bovine, cats, dogs, monkeys, etc.). The dose of the antibody of the present invention varies depending on subjects to be administered, diseases to be treated, symptoms, and routes for administration, etc. ; it is favorable to select the single dose of the antibody of the present invention at normally about 0.01 mg to about 20 mg/kg of body weight, preferably about 0.1 mg to about 10 mg/kg of body weight, more preferably about 0.1 mg to about 5 mg/kg of body weight, once to 5 times per day, preferably once to 3 times per day via intravenous injection. In parenteral and oral administrations, the dose corresponding to the above can be administered. In case with severe symptoms, the dose may be increased according to the symptoms.

The antibody of the present invention can be administered as it is, or as an appropriate component for drugs. The pharmaceutical composition to be administered as described above contains pharmaceutically acceptable carrier, diluents or vehicles to the antibody of the present invention or its salts. The composition can be provided in the pharmaceutical form applicable to oral or parenteral administration.

That is, examples of the composition include solid or liquid preparation, in more details, tablets (including sugar coated tablets, and film-coated tablets), pills, granules, powder forms, capsules (including soft capsules) , syrups, emulsions, suspensions, etc.

The composition is manufactured according to the publicly known methods and

contains carrier, diluents or vehicles, which are usually used in the pharmaceutical field. Examples of the component for carriers and vehicles for tablets include lactose, starch, sucrose and magnesium stearate, etc.

As the composition for parenteral administration, for example, injectable forms and suppositories are used; for injectable forms, subcutaneous, intracutaneous, intramuscular injections and infusion are included. The above-stated injectable preparations can be prepared in accordance with the publicly known methods, for example, through dissolution, suspension or emulsification of the above-described antibody or its salts in sterile aqueous solution or oily liquid usually applicable to preparation of injectable preparations. Examples of an aqueous medium for injection include physiological saline and an isotonic solution containing glucose and other auxiliary agents and may be used in combination with an appropriate dissolution aid such as an alcohol (e.g., ethanol) , a polyalcohol (e.g., propylene glycol and polyethylene glycol), a nonionic surfactant [e.g., polysorbate 80TH, HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)]. Examples of the oily medium include sesame oil and soybean oil, which may also be used in combination with a dissolution aid such as benzyl benzoate and benzyl alcohol. The thus-prepared solution for injection is normally filled in an appropriate ampoule. The suppository to be used for rectal administration is prepared by mixing the above-stated antibody or its salts with the conventional vehicle for suppositories.

It is advantageous to prepare the pharmaceutical preparation of the above-stated medical composition for oral or parenteral use in a unit dosage form meeting the dose of the active ingredient. Examples of the formulations in the administration unit include tablets, pills, capsules, injectable preparations (ampoules) and suppositories, etc. It is preferable to contain usually 5 mg to 500 mg of the above-stated antibody per unit preparation, in particular, 5 mg to 100 mg for injectable preparation and 10 mg to 250 mg for other preparation forms.

Incidentally, the above-stated respective compositions may contain other active ingredient, as far as combination with the above-stated antibody would not result in unfavorable interactions.

(7) DNA-transferred animals

The present invention provides non-human mammals carrying the extrinsic DNA encoding polypeptide of the present invention, etc. (hereinafter abbreviated as extrinsic DNA of the present invention) and the variant DNA (hereinafter sometimes referred to

as extrinsic variant DNA).

That is, the present invention provides the followings:

(1) Non-human mammals carrying the extrinsic DNA of the present invention and its variant DNA .

(2) Animals described in the above (1), which the non-human mammals are rodents.

(3) Animals described in the above (2), which the rodents are mice or rats, and

(4) Recombinant vector carrying either the extrinsic DNA of the present invention or its variant DNA, which can be expressed in mammals.

Non-human mammals carrying either the extrinsic DNA of the present invention or its variant DNA (hereinafter, abbreviated as the DNA-transferred animals) can be prepared by transferring the target DNA using calcium phosphate method, electric pulse method, lipofection method, coagulation method, micro-injection method, particle gun method, DEAE-dextran method, etc. to non-fertilized ovum, fertilized ovum, spermatozoon, and embryo cells including its spermatogonium, preferably at the stage of embryo genesis during the genesis of non-human mammals (more preferably at the unicellular stage or at the stage of fertilized ova, and also before octacellular stage in general). The DNA transfer method can transfer the extrinsic DNA of the present invention into somatic cells, organs and tissue cells, thereby utilizing them for cell culture and tissue culture, and further, the DNA-transferred animals of the present invention can be prepared by fusing these cells with the above-cited embryo cells by the publicly known cell fusion method.

Examples of the non-human mammals include, for example, bovine, swine, sheep , goats, rabbits, dogs, cats, guinea pigs, hamsters, mice, rats and the like. Among them, from the view-point of preparation of disease-affected animal models, rodents, it is preferable to use rodents which have relatively shorter period of ontogeny and biological cycles and are easily raised, in particular to use mice (e.g., as the pure line, C57BL/5 line, DBA2 line, BALB/c line, ICR line, etc.) or rats (e.g., Wistar, SD rats, etc.).

The "mammals" for the variant vectors which can expression mammals, include humans, in addition to above-stated non-human mammals.

The extrinsic DNA of the present invention does not mean the DNA of the present invention which is intrinsically possessed by non-human mammals, but the DNA of the present invention which is once isolated and extracted from mammals.

Examples of the variant DNA of the present invention include the DNA with a

certain variation (e.g., mutation) within the base sequence in the original DNA of the present invention, in more details, the DNA with addition of base, defect of base, and replacement with other base ; abnormal DNA is also included.

The above-stated abnormal DNA stands for the DNA expressing the abnormal polypeptide of the present invention ; for example, the DNA expressing the polypeptide which inhibits functions of the normal polypeptide of the present invention is employed.

The extrinsic DNA of the present invention is any of the DNA derived from either homogeneous or heterogeneous mammals to the target animal. When the DNA of the present invention is transferred to the target animal, it is generally advantageous to use the DNA in a gene construct ligated downstream of a promoter that can express the DNA in animal cells. For example, when the human DNA of the present invention is transferred, e.g., the DNA construct (e.g., vector, etc.), in which the human DNA of the present invention is ligated downstream of various promoters that can express the DNA derived from various mammals (e.g., rabbits, dogs, cats, guinea pigs, hamsters, rats, mice or the like) containing the DNA of the present invention highly homologous to the human DNA, is microinjected to mouse fertilized ova; thus, the DNA-transferred mammal, which is capable of producing a high level of the DNA of the present invention, can be produced.

Examples of the expression vector for the polypeptide of the present invention include plasmid derived from *Escherichia coli*, plasmid derived from *Bacillus subtilis*, plasmid derived from yeast, bacteriophage such as λ phase, retrovirus including Moloney's leukemia virus, animal viruses such as vaccinia virus or baculovirus, etc. Among them, plasmid derived from *Escherichia coli*, plasmid derived from *Bacillus subtilis* or plasmid derived from yeast are preferably employed.

Examples of the promoters that can regulate the DNA expression include ① the DNA promoters derived from virus (e.g., simian virus, cytomegalovirus, Moloney's leukemia virus, JC virus, mammalian cancer virus, poliovirus, etc.), ② the promoters derived from various mammals (humans, rabbits, dogs, cats, guinea pigs, hamsters, rats, mice, etc.), for example, albumin, insulin II, uropoquin II, elastase, erythropoietin, endothelin, myocreatinkinase, glia fiber acidic protein, glutathione-S-transferase, platelet-derived growth factor β , keratin-K1, K10 and K14, collagen type I and type II, cyclic AMP dependent proteinkinase β 1 subunit, dystrophin, tartaric acid resistant alkaline phosphatase, atrium sodium diuretic factor, endothelial receptor tyrosine kinase (usually abbreviated as Tie2), sodium potassium adenosin triphosphate

oxidation enzyme (Na, K-ATPase), neurofilament light chain, metallothionein I and IIA, metalloproteinase 1 tissue inhibitor, MHC class I antigen (H-2L), H-ras, rennin, dopamine β -hydroxylation enzyme, thyroid peroxidase (TPO), polypeptide chain elongation factor 1 α (EF-1 α), β actin, α and β myosin heavy chain, myosin light chain 1 and 2, myelin basic protein, thyroglobulin, Thy-1, immunoglobulin, H chain variable part (VNP), serum amyloid P component, myoglobin, troponin C, smooth muscle α actin, preproenkephalin A, and vasopressin, etc. Among them, it is advantageous to use cytomegalovirus promoter capable of highly expressing in the whole body, human polypeptide chain elongation factor 1 α (EF-1 α) promoter, human and chicken β actin promoter, etc.

The above-cited vectors are preferably to possess the sequence (generally, referred to as terminator) to terminate transcription of the target messenger RNA in DNA transferred mammals; for example, examples of such terminators include the one allowing use of the sequence of respective DNA derived from virus and various mammals, preferably SV40 terminator of simian virus.

Furthermore, for the purpose of highly expressing the target extrinsic DNA, it is feasible to ligate the splicing signal, enhancer region and a part of intron of eukaryote DNA either upstream a promoter region, between the promoter region and translation region, or downstream the translation region, depending upon the objective.

The said translation region can be prepared by conventional DNA technological methods in which the DNA construct that can express in the transferred animals is ligated downstream the above-stated promoter, or if necessary and desired, upstream the transfer termination region according to the conventional DNA technological procedures.

The transfer of the extrinsic DNA of the present invention at the fertilized egg cell secures the presence of the DNA in all germ and somatic cells in the produced mammals. The presence of the extrinsic DNA of the present invention in the germ cells in the DNA-transferred animal means that all germ and somatic cells contain the extrinsic DNA of the present invention in all progenies of the animal. The progenies of the animal that took over the gene contain the extrinsic DNA of the present invention in all germ and somatic cells.

The non-human mammals with extrinsic and normal DNA of the present invention being transferred can be maintained and bred in the conventional environment as the animals carrying the DNA of the present invention after confirming the stable retention of the gene in the animals through mating.

The transfer of the extrinsic DNA of the present invention at the fertilized egg cell secures the excessive presence of the DNA in all germ and somatic cells in the produced mammals. The excessive presence of the extrinsic DNA of the present invention in the germ cells in the DNA-transferred animal means that all germ and somatic cells contain excessive amount of the extrinsic DNA of the present invention in all progenies of the animal. The progenies of the animal that took over the gene contain excessive amount of the extrinsic DNA of the present invention in all germ and somatic cells.

Furthermore, mating male and female animals containing the objective DNA results in acquiring homozygote animals having the transferred DNA on both homologous chromosomes.

Since the normal DNA of the present invention is highly expressed in the non-human mammals in which the normal DNA of the present invention is carried, the animals can be used as the pathological model animals because stimulation of functions of the intrinsic normal DNA finally results in manifestation of hyperergasia of the polypeptide of the present invention. For example, it is possible to clarify the pathological mechanism of hyperergasia of diseases associated with polypeptides of the present invention and to investigate therapeutic methods of these diseases, by using the normal DNA-transferred animals of the present invention.

In addition, the mammals in which the extrinsic normal DNA of the present invention has been transferred can also be used for screening tests of therapeutic drugs of the diseases associated with the polypeptide of the present invention because the transferred animals present with symptoms attributable to increase in the liberated polypeptide of the present invention.

The non-human mammals with extrinsic abnormal DNA of the present invention being transferred can be maintained and bred in the conventional environment as the animals carrying the DNA of the present invention after confirming the stable retention of the gene in the animals through mating. Furthermore, the target extrinsic DNA is transferred into the aforementioned plasmid and then, used as the source for tissue culture. The DNA construct with the promoter can be prepared by the conventional DNA technological procedures. The transfer of the abnormal DNA of the present invention at the fertilized egg cell secures the presence of the DNA in all germ and somatic cells in the produced mammals. The presence of the abnormal DNA of the present invention in the germ cells in the DNA-transferred animal means that all germ and somatic cells contain the abnormal DNA of the present invention in all

progenies of the animal. The progenies of the animal that took over the gene contain the abnormal DNA of the present invention in all germ and somatic cells. Homozygote animals having the transferred DNA on both homologous chromosomes are acquired whereby mating male and female animals thus obtained can be bred to obtain the progenies having the target DNA.

Since the abnormal DNA of the present invention is highly expressed in the non-human mammals carrying the abnormal DNA of the present invention, inhibition of functions of the intrinsic normal DNA finally results in manifestation of the function—inactivated non-responder to the polypeptide of the present invention; therefore, it can be used as the pathological model animal. For example, it is possible to clarify the pathological mechanism of the function—inactivated non-responder to the polypeptide of the present invention and to investigate therapeutic methods of this disease, by using the abnormal DNA-transferred animals of the present invention.

As the specific applicability, the animals highly expressing the abnormal DNA of the present invention can be the model animals to be used for investigation of the mechanism involved in the function disorders (dominant negative effect) of the normal polypeptide by the abnormal polypeptide of the present invention in the function—inactivated non-responder to the polypeptide of the present invention.

Since the mammals in which the abnormal extrinsic DNA of the present invention has been transferred present with symptoms associated with increase of the liberated polypeptide of the present invention, these animals can also be used for screening tests of therapeutic drugs of the function—inactivated non-responder to the polypeptide of the present invention.

In addition, other applicability of the above-cited 2 kinds of the DNA-transferred animals of the present invention include the followings:

- ① Use as the cell source for tissue culture.
- ② Analysis of the relationship with the polypeptide to be specifically expressed or activated by the polypeptide of the present invention, by means of direct analysis of DNA or RNA in tissues of the DNA-transferred animals of the present invention, or analysis of the polypeptide tissues which are expressed by DNA.
- ③ Study on function of cells derived from tissues known to be hardly cultured, based on the usage or the cultured cells carrying the DNA by the standard tissue culture technology.
- ④ Screening of the drug candidates which are capable to potentiate functions of the cells by using the cells described above in ③, and

- ⑤ Isolation and purification of the variant polypeptide of the present invention and preparation of its antibody.

Using the DNA-transferred animals of the present invention, for example, the clinical symptoms due to function-inactivated non-responder to the polypeptide of the present invention and other diseases associated with the polypeptide of the present invention can be investigated. Furthermore, using these animals, more detailed pathological findings in respective organs of the disease models related to the polypeptide of the present invention can be obtained, thereby contributing to development of brand-new therapeutic remedies, furthermore, to research and treatment of secondary diseases of the said disease.

Respective organs are isolated from the DNA-transferred animals of the present invention, cut into small pieces, treated with polypeptide degrading enzyme such as trypsin, and then the liberated DNA-transferred cells are obtained; subsequently, it is possible to perform phylogenetic analysis of its culture or cultured cells. These organs permit identification of the polypeptide producing cells of the present invention, and investigation of correlation with apoptosis, differentiation or growth, mechanism of the signal transduction and further study on abnormality of them, thereby being used as useful materials for research for the polypeptide of the present invention and clarification of its mechanism of action.

Using the afore-mentioned test methods and quantification methods, it is possible to provide the efficient and quick screening method for therapeutic drugs of the diseases, whereby development of therapeutic drugs for the diseases associated with the polypeptide of the present invention, including function-inactivated non-responder to the polypeptide of the present invention by utilizing the DNA-transferred animal of the present invention. In addition, using the DNA-transferred animals of the present invention or the extrinsic DNA expressing vector of the present invention, it is possible to investigate and develop the DNA therapeutic method to treat diseases associated with the polypeptide of the present invention.

(8) Knock-out animals

The present invention provides the non-human mammal embryo stem cells in which the DNA of the present invention has been inactivated, and the non-human mammals with the inadequate expression of the DNA of the present invention.

That is, the present invention provides:

(1) Non-human mammal embryo stem cells in which the DNA of the present invention has been inactivated.

(2) The embryo stem cells as described in the above (1), in which the DNA has been inactivated by insertion of the reporter gene (e.g., β galactosidase gene derived from E. coli).

(3) The embryo stem cells as described in the above (1), which is resistant to neomycin.

(4) The embryo stem cells as described in the above (1), where rodents represent the non-human mammals.

(5) The embryo stem cells as described in the above (1), where rodents represent mice.

(6) The DNA insufficiently expressing non-human mammals in which the DNA of the present invention has been inactivated.

(7) The non-human mammals as described in the above (6), in which the DNA has been inactivated by insertion of the reporter gene (e.g., β galactosidase gene derived from *Escherichia coli*) and the reporter gene can express under regulation of the promoter to the DNA of the present invention.

(8) The non-human mammals as described in (6), where the non-human mammals are rodents.

(9) The non-human mammals as described in (8), where the rodents are mice, and

(10) The screening methods for the compounds or their salts that either promote or inhibit the promoter activity to the DNA of the present invention, characterized by detecting the expressed reporter gene following administration of the test compounds to the following cells or animals as described in (7).

Artificial variation is applied to the DNA of the present invention that is carried by the non-human mammals to inhibit the expression ability of the DNA or to actually eliminate the activity of the polypeptide of the present invention encoded by the DNA; then the obtained non-human mammal's embryo stem cells (hereinafter abbreviated as ES cells) in which the DNA has actually no expressing ability of the polypeptide of the present invention (hereinafter sometimes referred to as knocked-out DNA) are called as the non-human mammal's embryo stem cells in which the DNA of the present invention is inactivated.

As the non-human mammals, the same animals as stated above can be employed.

Examples of the methods to apply artificially variation to the DNA of the present invention include deletion of partial or the whole DNA of the present invention,

insertion of other DNA or replacement with other DNA. The knocked-out DNA of the present invention may be prepared by these variations, for example, staggering the reading frames of the codon, or destruction of function of the promoter or the exon.

As actual examples, the non-human mammal's embryo stem cells in which the DNA of the present invention has been inactivated (hereinafter, abbreviated as either the DNA inactivated ES cells of the present invention or the knock-out ES cells of the present invention) can be obtained by selecting the knock-out ES cells of the present invention through the following methods ; that is, ① the DNA of the present invention existing in the target non-human mammals is isolated, and to the exon region, drug resistant gene represented by neomycin resistant gene, hygromycin resistant gene, or the reporter genes represented by lacZ (β -galactosidase gene), cat (chloramphenicol acetyltransferase gene) , etc. are inserted to destruct the functions of the exon, or ② the DNA sequence terminating the transcription of the gene (e.g., poly A addition signals, etc.) is inserted to the intron region between the exons to eliminate the synthetic ability of complete messenger RNA; and subsequently, the DNA chain carrying the DNA sequence to destruct the gene (hereinafter abbreviated as the targeting vector) is inserted into the chromosomes of the animal by, for example, the homologous recombination method. Then, the resultant ES cells are analyzed by the Southern hybridization analysis by using the DNA of the present invention or the near-by DNA sequence as the probe, or the PCR method with use of the DNA sequence on the targeting vector and the near-by DNA sequence except for the DNA of the invention which has been used for preparation of the targeting vector, as the probe.

The ES cells already established as stated above may be subjected to inactivation of the DNA of the present invention by homologous recombination, etc. and alternatively, the newly established ES cells in accordance with the publicly known Evans and Kaufman's method may also be used. In the case of ES cells from mice, for example, the ES cells of 129 strain is generally employed; however, since the immunological background is unclear, due to clearness of immunological and genetic background, BDF₁ mice (F₁ of C57BL/6 and DBA/2) that is produced by cross between DBA/2 with C57BL/6 mice or C57BL/6 and is characterized with improved number of ovulation may also be favorably used. In addition to advantages endowed to BDF₁ mice such as large number of ovulation and tough nature of eggs, BDF₁ mice has C57BL/6 mice as the background ; furthermore, when the pathological model mice is generated, they can be advantageously used in that the hereditary backgrounds of the ES cells obtained from BDF₁ mice can be replaced with C57BL/6 mice following

backcross with C57BL/6 mice.

When ES cells are established, blastocyst at 3.5 days after fertilization is generally used, but except for this, eggs under eight cell stage are collected and then cultured, leading to efficient collection of large number of initial embryo through culture up to the stage of blastocyst.

ES cells of both sexes can be used, but male ES cells are more favorable in preparation of genital chimera. It is also desirable to make judgement of male or female at early stages as possible for the benefit of reducing unnecessary labors involved in laborious cultures.

One example of judgement whether ES cells are male or female consists of amplification and detection of the gene located in the sex determining region on Y chromosome by PCR method. This method requires approximately as small as one colony of ES cells (about 50 cells) in sharp contrast with approximately 10^6 cells being required for nuclear type analysis, permitting the initial selection of ES cells at the early stage of culture by means of judgment of male or female, together with remarkable reduction of labors at the early stage of culture due to possible selection of male cells even at an early stage.

The second selection can be conducted by confirmation of the chromosome number based on G-Banding method. The number of chromosome to be obtained from the ES cells is expected to be 100%, if possible ; however, when it is difficult to secure 100% due to physical procedures etc. ,upon establishment, it is desirable to knock-out the gene of the ES cells and then to make cloning to the normal cells (e.g., the cells with the number of chromosome; $2n=40$ in the case of mice) again.

Although the embryo stem cell strain thus obtained usually demonstrates excellent multiplication, this strain tends to lose its ability of ontogeny, indicating necessity of careful subcultures. For example, this strain is to be cultured at about 37°C on the appropriate feeder cells such as STO fibroblast cells in CO_2 incubator (preferably, 5% CO_2 , 95% air or 5% O_2 , 5% CO_2 and 90% air) in the presence of LIF (1 – 10000U/ml) ; subsequently, upon subcultures, the strain shall be treated with trypsin/EDTA solution (usually, 0.001 – 0.5% trypsin/0.1 – 5mM EDTA, preferably approximately 0.1% trypsin/1mM EDTA) to obtain single cells, which are charged on the freshly prepared feeder cells. These subcultures are usually performed every 1 – 3 days. On such occasions, cells are microscopically observed and when any morphologically abnormal cells are detected, it is desirable to discard this culture cell.

When the ES cells are subjected to monolayer culture up to the higher density

under appropriate conditions, or suspension culture until cellular mass is formed, the ES cells can be differentiated to become various types of cells including parietal muscle, visceral muscle and myocardium [M. J. Evans and M. H. Kaufman, Nature, vol 292, 154, 1981; G. R. Martin Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. vol 78, 7634, 1981 ;
5 T.C. Doetschman et al., Journal of Embryology and Experimental Morphology, vol 87, 27, 1985]. The DNA inadequately-expressing cells that are obtained from the ES cells of the present invention by differentiation are useful in cellular biological investigations of polypeptide of the present invention.

By relatively comparing the expression through determination of mRNA amount
10 of the animal by the publicly known procedures, the non-human mammals with inadequately expressing DNA of the present invention can be distinguished from normal animals.

As the non-human mammals, the same animals as stated above can be employed.

Where the targeting vector as prepared stated above is introduced into mouse
15 embryo stem cells or mouse egg cells and after introduction, the DNA sequence of the inactivated DNA of the present invention in the targeting vector can replace the DNA of the present invention on chromosome of mouse embryo stem cells or mouse egg cells, by the so called homologous recombination, the DNA of the present invention can be knocked-out in the DNA inadequately expressing non-human mammals of the
20 present invention.

The cells with the DNA of the present invention being knocked out can be detected by either Southern hybridization using the DNA sequence of the present invention or the nearby DNA sequence as the probe, or the PCR method analysis with use of the DNA sequence on the targeting vector and the nearby DNA sequence as the
25 primer ; in the meantime, the nearby DNA sequence stands for the DNA sequence except for the DNA of the present invention that is derived from mice and used as the targeting vector. When the non-human mammal embryo stem cells are used, homologous recombination of the gene is conducted to perform cloning of the cell strains having the inactivated DNA of the present invention and then, at the appropriate
30 time, for example, these cells are infused into non-human mammal embryo or blastocyst at the eight cells stage, followed by transplantation of the thus prepared chimera embryo into the uterus of pseudo-pregnant non-human mammals. The resultant animal is a chimera animal comprising the cells with the normal DNA locus of the present invention and the cells with the artificially mutated DNA locus of the present
35 invention.

When a part of the reproductive cells of the chimera animals possesses the partially mutated DNA locus of the present invention, the animal comprising the cells in all the tissues, carrying the artificially mutated DNA locus of the present invention can be obtained by selection, for example, with coat color judgment from the animal groups that are obtained by mating of the chimera animal with the normal animal. Usually, the animal thus obtained presents with inadequate hetero expression of the polypeptide of the present invention; therefore, mutual mating of the animal with the inadequate hetero expression of the polypeptide of the present invention and subsequent selection of F₁ offsprings leads to obtaining the animals with the inadequate homo expression of the polypeptide of the present invention.

In case of using egg cells, for example, transgenic non-human mammals carrying the targeting vector in the chromosome can be obtained by infusion of the DNA solution into the nucleus of the egg cell by microinjection method. Further, in comparison with the transgenic non-human mammals, the mammals having the mutation in the DNA locus of the present invention through the genetic homologous recombination can be obtained.

After confirmation that the animal obtained by mating has the knocked-out DNA, the animals having the knocked-out DNA of the present invention can be bred and subcultured under the conventional breeding conditions.

Furthermore, the conventional methods are applicable to establishment and maintenance of the germ line. In more details, mating of the animals of both sexes carrying the inactivated DNA can produce the homozygous animals that have the inactivated DNA on both homologous chromosomes. The homozygous animal can be efficiently obtained by raising under the condition comprising the following combination ratio of animals such as a normal animal and plural number of homozygous animals against a dam. By mating of males and females of heterozygous animals, the homozygous animals and the heterozygous animals having the inactivated DNA can be bred and subcultured.

The non-human mammal's embryonic stem cells containing the inactivated DNA of the present invention are remarkably useful when the non-human mammals with the inadequately expressing DNA of the present invention are prepared.

Since the non-human mammals with the inadequately expressing DNA of the present invention are devoid of various biological activities which can be induced by the polypeptide of the present invention, these animals are qualified to be the animal models presenting with these diseases that are caused by inactivation of the biological

activities of the present polypeptide of the present invention; therefore, they can be useful in investigation of pathological studies and therapeutic methods of these diseases.

- 5 (8a) Screening methods for the compounds that exert the prophylactic/therapeutic effects against diseases attributable to deletion and lesion of the DNA of the present invention.

10 The non-human mammals with the inadequately expressing DNA of the present invention can be used for screening of the compounds that have the prophylactic/therapeutic effects against the diseases (e.g., cancer, immunological diseases, respiratory tract diseases, digestive tract diseases, cardiovascular diseases, endocrinological diseases, infections, nervous system diseases and psychological diseases, etc.) attributable to deletion and lesion of the DNA of the present invention.

15 That is, the present invention provides the screening methods of the compounds or their salts that have the prophylactic/therapeutic effects against diseases caused by the deletion and lesion of the DNA of the present invention, following administration of the test compounds to the non-human mammals with the inadequately expressing DNA of the present invention and then observation/determination of the changes of the animals in question.

20 As the non-human mammals with the inadequately expressing DNA of the present invention that are used in the above-stated screening methods, the same as those afore-mentioned can be referred to.

25 Examples of the test compounds include peptides, proteins, non-peptide compounds, synthetic compounds, fermentation products, cell extracts, plant extracts, and animal tissue extracts and plasma, etc., but these compounds are any of new compounds or the publicly known compounds.

30 In detail, the non-human mammals with the inadequately expressing DNA of the present invention are treated with the test compounds and they are compared with the intact reference animals, whereby the prophylactic/therapeutic effects of the test compounds can be assayed with use of changes in respective organs, tissues of the animal and symptoms of the diseases as the index.

35 Examples of the treatment methods of the test animals with the test compounds include oral administration and intravenous injection, but they can be properly selected depending on the symptoms of the test animals and properties of the test compounds. The dosage of the test compound can be properly selected according to profiles of the

test compounds.

When the compound possessing the prophylactic/therapeutic effects against pancreas dysfunction is to be screened, for example, glucose loading treatment is conducted to the non-human mammals with the inadequately expressing DNA of the present invention and after administration of the test compound before or after glucose loading, the time-course change of blood sugar levels and body weights of the animals is determined.

The compounds to be obtained through the screening of the present invention are those compounds selected from the above-stated test compounds. Since they have the prophylactic/therapeutic effects against the diseases (e.g., cancer, immunological diseases, respiratory tract diseases, digestive tract diseases, cardiovascular diseases, endocrinological diseases, infections, nervous system diseases and psychological diseases, etc.) attributable to deletion and lesion of the polypeptide of the present invention, they can be used as the drugs characteristic of safe and low toxic prophylactic/therapeutic agents against these diseases. Furthermore, the compounds derivatized from the compounds obtained by the above-stated screening can be also employed in the similar manner.

The compounds obtained by the screening may be used in their salt's forms. As the salts of these compounds, the salts with physiologically acceptable acids (e.g., inorganic and organic acids) and bases (e.g., alkaline metals) may be used, in particular salts with physiologically acceptable acids being preferable. Examples of such salts include salts with inorganic acids (e.g., hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrogen bromide, sulfuric acid), or organic acids (e.g., acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid) and the like.

The pharmaceuticals comprising the compounds and their salts obtained by the screening method can be manufactured in the similar manners as those for the drugs comprising the polypeptide of the present invention as described above.

Since the thus obtained pharmaceutical preparation is safe and low toxic, the preparation can be administered to humans or mammals (e.g., rats, mice, guinea pigs, rabbits, sheep, swine, bovine, horses, cats, dogs, monkeys, etc.).

The doses of the compounds or their salts of the present invention vary depending on target diseases, subjects to be administered, and routes for administration, etc. ; when a compound is orally administered for the purpose of treatment of inflammatory diseases, the dose to an adult (as 60 kg body weight) is normally about

0.1mg to about 100 mg, preferably about 1.0 mg to about 50 mg, more preferably about 1.0 mg to about 20 mg per day. In parenteral administration, the single dose of the said compound varies depending on subjects to be administered, target diseases, etc. but it is advantageous, e.g., for treatment of inflammatory diseases of the adult patient (as 60 kg body weight), to inject intravenously the compound in a daily dose of about 0.01 mg to 30 mg, preferably about 0.1 mg to about 20 mg, more preferably about 0.1 mg to about 10 mg. For other animal species, the corresponding dose as converted per 60 kg body weight can be administered.

- 10 (8b) Screening methods for the compounds that promote or inhibit the activity of the promoter against the DNA of the present invention.

The present invention provides the screening method for the compound or its salts that promote or inhibit the activity of the promoter against the DNA of the present invention, characterized by detecting expression of the reporter gene after administration of the test compound to the non-human mammals with the inadequately expressing DNA of the present invention.

In the above-stated screening method, the non-human mammals with the inadequately expressing DNA of the present invention, to be employed are the non-human mammals with the inadequately expressing DNA of the present invention in which the DNA of the present invention is inactivated by introduction of the reporter gene, together with the reporter gene being able to express under regulation of the promoter against the DNA of the present invention.

As the test compound, the same as stated above are included.

As the reporter gene, the same as stated above can be employed and it is advantageous to use β galactosidase gene (lacZ), soluble alkaline phosphatase gene or luciferase gene.

In the non-human mammals with the inadequately expressing DNA of the present invention in which the DNA of the present invention is replaced with the reporter gene, tracing the expression of the substance encoded by the reporter gene permits detection of activities of the promoter because the reporter gene exists under the regulation of the promoter against the DNA of the present invention.

For example, when a part of the DNA region encoding the polypeptide of the present invention is replaced with the β galactosidase gene (lacZ) derived from Escherichia coli, β galactosidase gene is expressed instead of the polypeptide of the present invention, in the tissues where the polypeptide of the present invention is

expressed in situ. Accordingly, when staining is performed with use of the reagent such as 5-bromo-4-chloro-3-indoryl- β -galactopiranoside (X-gal) known to be the substrate of β -galactosidase, expression status of the polypeptide of the present invention can be easily observed in vivo. In more details, the mice with defect of the polypeptide of the present invention or its tissue section is fixed in glutalaldehyde, washed with phosphate-buffered physiological saline (PBS), treated with the dye solution containing X-gal at room temperature or 37°C for approximately 30 minutes or 1 hour, followed by rinsing the tissue specimen with 1mM EDTA/PBS solution to stop the β galactosidase reaction for observation of the color reaction. Alternatively, mRNA encoding lacZ may be detected according to the conventional method.

The compound and its salts that are obtained by the above-stated screening method are selected among the afore-mentioned test compounds, besides being the compound to promotes or inhibits activities of the promoter against the DNA of the present invention.

The compound thus obtained by the screening method may form its salts and as the salts of the compound, the salts with physiologically acceptable acids (e.g., inorganic acids) and bases (e.g., organic acids) are employed; among them, however, it is preferable to use the salts with physiologically acceptable acids addition salts above all. Examples of such salts include salts with, for example, inorganic acids (e.g., hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid); salts with organic acids (e.g., acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid) and the like.

The compound or its salts that promote the activities of the promoter against the DNA of the present invention can either promote expression of the polypeptide of the present invention, and promote functions of the polypeptide; therefore, they are useful as the prophylactic/therapeutic agents with safe and low toxic properties, for example, against diseases such as cancer, immunological diseases, respiratory tract diseases, digestive tract diseases, cardiovascular diseases, endocrinological diseases, infections, nervous system diseases and psychological diseases, etc.

Furthermore, the compounds derivatized from the compounds obtained by the above-stated screening can be also employed in the similar manner.

The drugs containing the compound or its salts that have been obtained by the screening method can be manufactured in the similar manners as those drugs containing the polypeptide of the present invention and its salts as stated above.

Since the thus obtained pharmaceutical preparation is safe and low toxic, the preparation can be administered to humans or mammals (e.g., rats, mice, guinea pigs, rabbits, sheep, swine, bovine, horses, cats, dogs, monkeys, etc.).

5 The doses of the compounds or their salts of the present invention vary depending on target diseases, subjects to be administered, and routes for administration, etc. ; when a compound is orally administered for the purpose of treatment of diseases , for example, cancer, immunological diseases, respiratory tract diseases, digestive tract diseases, cardiovascular diseases, endocrinological diseases, infections, nervous
10 system diseases and psychological diseases, etc., the dose to an adult (as 60 kg body weight) is normally about 0.1mg to about 100 mg, preferably about 1.0 mg to about 50 mg, more preferably about 1.0 mg to about 20 mg per day. In parenteral administration, the single dose of the said compound varies depending on subjects to be administered, target diseases, etc. but it is advantageous, e.g., for treatment of
15 inflammatory diseases of the adult patient (as 60 kg body weight), to inject intravenously the compound to promote the promoter activity against the DNA of the present invention in a daily dose of about 0.01 mg to 30 mg, preferably about 0.1 mg to about 20 mg, more preferably about 0.1 mg to about 10 mg. For other animal species, the corresponding dose as converted per 60 kg body weight can be administered.

20 On the other hand, when the compound is orally administered to inhibit the promoter activity against the DNA of the present investigation, the dose of the compound to an adult (as 60 kg body weight) is normally about 0.1mg to about 100 mg, preferably about 1.0 mg to about 50 mg, more preferably about 1.0 mg to about 20 mg per day. In parenteral administration, the single dose of the said compound varies
25 depending on subjects to be administered, target diseases, etc. but it is advantageous to administer in the parenteral form the compound to inhibit the promoter activity against the DNA of the present invention to the adult patient (as 60 kg body weight) in a daily dose of about 0.01 mg to 30 mg, preferably about 0.1 mg to about 20 mg, more preferably about 0.1 mg to about 10 mg. For other animal species, the corresponding
30 dose as converted per 60 kg body weight can be administered.

Thus, the non-human mammals with the inadequately expressing DNA of the present invention are extremely useful in screening the compound or its salts that possess promoting or inhibiting activities of the promoter against the DNA of the present invention; therefore, they may greatly contribute to investigation of pathology
35 of various diseases attributable to inadequate expression of the DNA of the present

invention and development of the prophylactic/therapeutic agents.

In the specification and drawings, the codes of bases and amino acids are denoted in accordance with the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature or by the common codes in the art, and examples of which are shown below. For amino acids that may have the optical isomer, L form is presented unless otherwise indicated.

DNA : deoxyribonucleic acid

cDNA : complementary deoxyribonucleic acid

A : adenine

10 T : thymine

G : guanine

C : cytosine

RNA : ribonucleic acid

mRNA : messenger ribonucleic acid

15 dATP : deoxyadenosine triphosphate

dTTP : deoxythymidine triphosphate

dGTP : deoxyguanosine triphosphate

dCTP : deoxycytidine triphosphate

ATP : adenosine triphosphate

20 EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

SDS : sodium dodecyl sulfate

Gly : glycine

Ala : alanine

Val : valine

25 Leu : leucine

Ile : isoleucine

Ser : serine

Thr : threonine

Cys : cysteine

30 Met : methionine

Glu : glutamic acid

Asp : aspartic acid

Lys : lysine

Arg : arginine

35 His : histidine

	Phe	: phenylalanine
	Tyr	: tyrosine
	Trp	: tryptophan
	Pro	: proline
5	Asn	: asparagines
	Gln	: glutamine
	pGlu	: pyroglutamic acid

10 The substituents, protective groups and reagents, which are frequently used throughout the specification are shown by the following abbreviations.

	Me	: methyl
	Et	: ethyl
	Bu	: butyl
	Ph	: phenyl
15	TC	: thiazolidine-4 (R)-carboxamide
	Tos	: p-toluenesulfonyl
	CHO	: formyl
	Bzl	: benzyl
	Cl ₂ Bzl	: 2,6-dichlorobenzyl
20	Bom	: benzyloxymethyl
	Z	: benzyloxycarbonyl
	Cl-Z	: 2-chlorobenzyloxycarbonyl
	Br-Z	: 2-bromobenzyloxycarbonyl
	Boc	: t-butoxycarbonyl
25	DNP	: jinitrophenol
	Trt	: trityl
	Bom	: t-butoxymethyl
	Fmoc	: N-9-fluorenylmethoxycarbonyl
	HOBt	: 1-hydroxybenztriazole
30	HOObt	: 3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine
	HONB	: 1-hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboximide
	DCC	: N,N'-dicyclohexylcarbodiimide

35 The sequence identification numbers in the sequence listing of the specification indicates the following sequence, respectively.

[SEQ ID NO:1]

This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-480 of the present invention.

[SEQ ID NO:2]

5 This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-546 of the present invention.

[SEQ ID NO:3]

This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-595 of the present invention.

10 [SEQ ID NO:4]

This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-623 of the present invention.

[SEQ ID NO:5]

15 This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-624 of the present invention.

[SEQ ID NO:6]

This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-625 of the present invention.

[SEQ ID NO:7]

20 This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-628 of the present invention.

[SEQ ID NO:8]

This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-708 of the present invention.

25 [SEQ ID NO:9]

This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-711 of the present invention.

[SEQ ID NO:10]

30 This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-714 of the present invention.

[SEQ ID NO:11]

This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-715 of the present invention.

[SEQ ID NO:12]

35 This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-749 of the

present invention.

[SEQ ID NO:13]

This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-768 of the present invention.

5 [SEQ ID NO:14]

This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-772 of the present invention.

[SEQ ID NO:15]

10 This shows the amino acid sequence of human-derived polypeptide TGC-790 of the present invention.

[SEQ ID NO:16]

This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-480 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:1.

[SEQ ID NO:17]

15 This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-546 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:2.

[SEQ ID NO:18]

This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-595 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:3.

20 [SEQ ID NO:19]

This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-623 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:4.

[SEQ ID NO:20]

25 This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-624 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:5.

[SEQ ID NO:21]

This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-625 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:6.

[SEQ ID NO:22]

30 This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-628 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:7.

[SEQ ID NO:23]

This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-708 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:8.

35 [SEQ ID NO:24]

This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-711 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:9.

[SEQ ID NO:25]

This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-714 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:10.

[SEQ ID NO:26]

This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-715 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:11.

[SEQ ID NO:27]

This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-749 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:12.

[SEQ ID NO:28]

This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-768 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:13.

[SEQ ID NO:29]

This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-772 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:14.

[SEQ ID NO:30]

This shows the base sequence of DNA encoding human-derived polypeptide TGC-790 of the present invention, which has the amino acid sequence shown by SEQ ID NO:15.

[SEQ ID NO:31]

This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 1.

[SEQ ID NO:32]

This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 1.

[SEQ ID NO:33]

This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 2.

[SEQ ID NO:34]

This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 2.

[SEQ ID NO:35]

This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 3.

[SEQ ID NO:36]

This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 3.

[SEQ ID NO:37]

This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 4.

[SEQ ID NO:38]

This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 4.
[SEQ ID NO:39]

This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 5.
[SEQ ID NO:40]

5 This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 5.
[SEQ ID NO:41]

This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 6.
[SEQ ID NO:42]

10 This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 6.
[SEQ ID NO:43]

This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 7.
[SEQ ID NO:44]

This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 7.
[SEQ ID NO:45]

15 This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 8.
[SEQ ID NO:46]

This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 8.
[SEQ ID NO:47]

20 This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 9.
[SEQ ID NO:48]

This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 9.
[SEQ ID NO:49]

This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 10.
[SEQ ID NO:50]

25 This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 10.
[SEQ ID NO:51]

This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 11.
[SEQ ID NO:52]

30 This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 11.
[SEQ ID NO:53]

This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 12.
[SEQ ID NO:54]

This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 12.
[SEQ ID NO:55]

35 This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 13.

[SEQ ID NO:56]

This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 13.

[SEQ ID NO:57]

This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 14.

5 [SEQ ID NO:58]

This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 14.

[SEQ ID NO:59]

This shows the base sequence of the primer for 5' end as described in EXAMPLE 15.

[SEQ ID NO:60]

10 This shows the base sequence of the primer for 3' end as described in EXAMPLE 15.

[SEQ ID NO:61]

This shows the base sequence of the primer as described in EXAMPLE 16.

[SEQ ID NO:62]

This shows the base sequence of the primer as described in EXAMPLE 16.

15 [SEQ ID NO:63]

This shows the base sequence of the primer as described in EXAMPLE 17.

[SEQ ID NO:64]

This shows the base sequence of the primer as described in EXAMPLE 17.

[SEQ ID NO:65]

20 This shows the base sequence of the primer as described in EXAMPLE 18.

[SEQ ID NO:66]

This shows the base sequence of the primer as described in EXAMPLE 18.

[SEQ ID NO:67]

This shows the base sequence of the primer as described in EXAMPLE 19.

25 [SEQ ID NO:68]

This shows the base sequence of the primer as described in EXAMPLE 19.

[SEQ ID NO:69]

This shows the base sequence of the primer as described in EXAMPLE 20.

[SEQ ID NO:70]

30 This shows the base sequence of the primer as described in EXAMPLE 20.

The present invention is described in detail below with reference to REFERENCE EXAMPLES and EXAMPLES, but is not deemed to limit the scope of the present invention thereto. The gene manipulation procedures using *Escherichia coli* were performed according to the methods described in the Molecular cloning.

35

EXAMPLE 1

Selection of TGC-480 from the data base and analysis of the base sequence

Among the EST database supplied by Smithkline Beecham LTD. (SB), the clone
 5 supposed to code the signal sequence contributing to secretion and the processing
 region were selected. In more detail, the DNA sequences of the EST were translated
 to the corresponding amino acid sequences and then the clone having the cluster of the
 hydrophobic amino acids (Leu, Ile, Val, Ala, etc.) after Met and further carrying the
 reserved sequence (Arg-Arg, Lys-Arg, Lys-Lys) at the processing region within the
 10 same frame was selected. As the result, HGS:558273 was discovered as the EST
 clone that satisfied these conditions. However, taking into account the fact that there
 was a possibility for the EST sequence to have deletion, insertion and miscoding of the
 base sequence as well as the fact that the EST sequence is a partial sequence of cDNA,
 SB was kindly requested to send this clone as TGC-480 to us and the whole base
 15 sequence of the insertion DNA fragment in the plasmid was determined by using
 fluorescent DNA sequencer (ABI PRINSMTH 377, Perkin Elmer). The results
 indicated that the insertion sequence (cDNA) of the clone carried the open reading
 frame for 378 bases as represented by SEQ ID NO:16, which encoded the polypeptide
 comprising 125 amino acid residue as shown by SEQ ID NO:1. The residue
 20 consisting of 21 amino acids at N-terminus as shown by SEQ ID NO:1 was anticipated
 to be the signal sequence for secretion. It was also verified that this clone expressed
 in brain, testis, heart, etc.

The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the
 above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID
 25 NO:16, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g.,
 ATGGCCAAGTACCTGGCCCAGATCA and
 TCACGTATGGGGCATCTGCCCTTTT) were prepared, followed by employment of
 the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., brain, testis, heart, etc.) or RT-PCR
 with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the
 30 cDNA fragment. In detail, the solution 50 µl containing 5 pmol of the each primer, 5
 µl of 100 mM Tris-HCl buffer (pH9.0), 5 µl of 500 mM potassium chloride solution, 3
 µl of 25 mM magnesium chloride solution, 4 µl of 2.5 mM deoxyribonucleotide
 solution, 1 µl of cDNA solution, and 0.5 µl of TaKaRa TaqTM was prepared. The PCR
 reaction was performed according to the following program, namely, the resultant
 35 solution was placed at 95°C for 1 minute in TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (Takara

shuzo Co.,Ltd.), then at 95°C for 30 seconds, at 65°C for 1 minute and at 72°C for 2 minutes; this cycle was repeated 35 times in total and further reacted at 72°C for 10 minutes to obtain the target PCR fragment.

5 EXAMPLE 2

Selection of TGC-546 from the data base and analysis of the base sequence

After selection of HGS:447917 by the similar method as described in EXAMPLE 1, this clone was received as TGC-546 and then the base sequence was confirmed. As the result, it was revealed that the insertion sequence (cDNA) of the clone carried
10 the open reading frame for 366 bases as represented by SEQ ID NO:17, which encoded the polypeptide comprising 121 amino acid residue as represented by SEQ ID NO:2. The residue consisting of 23 amino acids at N-terminus of the amino acid sequence as represented by SEQ ID NO:2 was anticipated to be the signal sequence for secretion. It was also verified that this clone expressed in epididymis.

15 The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID NO:17, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g., ATGCACAGATCAGAGCCATTCTGA and TTACAGTAGTGGCAGTAACACTTGG) were prepared, followed by employment of
20 the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., epididymis, etc.) or RT-PCR with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the cDNA fragment. The reaction conditions to be applied to PCR were those as described in EXAMPLE 1.

25 EXAMPLE 3

Selection of TGC-595 from the data base and analysis of the base sequence

After selection of HGS:1006634 by the similar method as described in EXAMPLE 1, this clone was received as TGC-595 and then the base sequence was confirmed. As the result, it was revealed that the insertion sequence (cDNA) of the
30 clone carried the open reading frame for 672 bases as referred to as SEQ ID NO:18, which encoded the polypeptide comprising 223 amino acid residue as shown by SEQ ID NO:3. The residue consisting of 19 amino acids at N-terminus of the amino acid sequence as shown by SEQ ID NO:3 was anticipated to be the signal sequence for secretion. It was also verified that this clone expressed in spinal cord, T cells, retina,
35 etc.

The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID NO:18, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g., ATGAAGTTCGTCCCCTGCCTCCTGC and TCACCCTCGGAAGAAGCTGATGAGA) were prepared, followed by employment of the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., spinal cord, T cells, retina, etc.) or RT-PCR with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the cDNA fragment. The reaction conditions to be applied to PCR were those as described in EXAMPLE 1.

EXAMPLE 4

Selection of TGC-623 from the data base and analysis of the base sequence

After selection of HGS:92551 by the similar method as described in EXAMPLE 1, this clone was received as TGC-623 and then the base sequence was confirmed. As the result, it was revealed that the insertion sequence (cDNA) of the clone carried the open reading frame for 747 bases as referred to as SEQ ID NO:19, which encoded the polypeptide comprising 248 amino acid residue as shown by SEQ ID NO:4. The residue consisting of 21 amino acids at N-terminus of the amino acid sequence as shown by SEQ ID NO:4 was anticipated to be the signal sequence for secretion. It was also verified that this clone expressed in cerebellum, adrenal, etc.

The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID NO:19, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g., ATGGGACCTGTGCGGTTGGAATAT and TCAAAGATCTTCTCGGTCAAGTTTG) were prepared, followed by employment of the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., cerebellum, adrenal, etc.) or RT-PCR with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the cDNA fragment. The reaction conditions to be applied to PCR were those as described in EXAMPLE 1.

EXAMPLE 5

Selection of TGC-624 from the data base and analysis of the base sequence

After selection of HGS:1731120 by the similar method as described in EXAMPLE 1, this clone was received as TGC-624 and then the base sequence was confirmed. As the result, it was revealed that the insertion sequence (cDNA) of the

clone carried the open reading frame for 522 bases as referred to as SEQ ID NO:20, which encoded the polypeptide comprising 173 amino acid residue as shown by SEQ ID NO:5. The residue consisting of 19 amino acids at N-terminus of the amino acid sequence as shown by SEQ ID NO:5 was anticipated to be the signal sequence for secretion. It was also verified that this clone expressed in dendritic cells, T cells, etc.

The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID NO:20, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g., ATGTTTTGCCCACTGAACTCATCC and TCATGAAAATATCCATTCTACCTTG) were prepared, followed by employment of the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., dendritic cells, T cells, etc.) or RT-PCR with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the cDNA fragment. The reaction conditions to be applied to PCR were those as described in EXAMPLE 1.

EXAMPLE 6

Selection of TGC-625 from the data base and analysis of the base sequence

After selection of HGS:1014817 by the similar method as described in EXAMPLE 1, this clone was received as TGC-625 and then the base sequence was confirmed. As the result, it was revealed that the insertion sequence (cDNA) of the clone carried the open reading frame for 786 bases as referred to as SEQ ID NO:21, which encoded the polypeptide comprising 261 amino acid residue as shown by SEQ ID NO:6. The residue consisting of 20 amino acids at N-terminus of the amino acid sequence as shown by SEQ ID NO:6 was anticipated to be the signal sequence for secretion. It was also verified that this clone expressed in vascular endothelial cells, bone marrow, etc.

The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID NO:21, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g., ATGGAAGTCTTCAAGTGACCATTC and TCAGTTCTTGTTTTTCCTTGTGCA) were prepared, followed by employment of the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., vascular endothelial cells, bone marrow, etc.) or RT-PCR with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the cDNA fragment. The reaction conditions to be applied to PCR were those as described in EXAMPLE 1.

EXAMPLE 7

Selection of TGC-628 from the data base and analysis of the base sequence

After selection of HGS:1878022 by the similar method as described in EXAMPLE 1, this clone was received as TGC-628 and then the base sequence was confirmed. As the result, it was revealed that the insertion sequence (cDNA) of the clone carried the open reading frame for 732 bases as referred to as SEQ ID NO:22, which encoded the polypeptide comprising 243 amino acid residue as shown by SEQ ID NO:7. The residue consisting of 30 amino acids at N-terminus of the amino acid sequence as shown by SEQ ID NO:7 was anticipated to be the signal sequence for secretion. It was also verified that this clone expressed in thymus, placenta, etc.

The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID NO:22, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g., ATGCGACCCCAGGGCCCCGCCGCTT and TTATTTTGGTAGTTCTTCAATAATG) were prepared, followed by employment of the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., thymus, placenta, etc.) or RT-PCR with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the cDNA fragment. The reaction conditions to be applied to PCR were those as described in EXAMPLE 1.

EXAMPLE 8

Selection of TGC-708 from the data base and analysis of the base sequence

After selection of HGS:2346555 by the similar method as described in EXAMPLE 1, this clone was received as TGC-708 and then the base sequence was confirmed. As the result, it was revealed that the insertion sequence (cDNA) of the clone carried the open reading frame for 450 bases as referred to as SEQ ID NO:23, which encoded the polypeptide comprising 149 amino acid residue as shown by SEQ ID NO:8. The residue consisting of 18 amino acids at N-terminus of the amino acid sequence as shown by SEQ ID NO:8 was anticipated to be the signal sequence for secretion. It was also verified that this clone expressed in monocytes.

The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID NO:23, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g., ATGAAGTTACAGTGTGTTTCCCTTT and TCAGGAGGCCGATGGGGGCCAGCAC) were prepared, followed by employment

of the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., monocytes, etc.) or RT-PCR with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the cDNA fragment. The reaction conditions to be applied to PCR were those as described in EXAMPLE 1.

5

EXAMPLE 9

Selection of TGC-711 from the data base and analysis of the base sequence

After selection of HGS:809616 by the similar method as described in EXAMPLE 1, this clone was received as TGC-711 and then the base sequence was confirmed.

10 As the result, it was revealed that the insertion sequence (cDNA) of the clone carried the open reading frame for 411 bases as referred to as SEQ ID NO:24, which encoded the polypeptide comprising 136 amino acid residue as shown by SEQ ID NO:9. The residue consisting of 20 amino acids at N-terminus of the amino acid sequence as shown by SEQ ID NO:9 was anticipated to be the signal sequence for secretion. It
15 was also verified that this clone expressed in cerebellum, lung, etc.

The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID NO:24, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g., ATGGCCAGCCTGGGGCTGCTGCTCC and
20 TCATGAGGCTCCTGCAGAGGTCTGA) were prepared, followed by employment of the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., cerebellum, lung, etc.) or RT-PCR with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the cDNA fragment. The reaction conditions to be applied to PCR were those as described in EXAMPLE 1.

25

EXAMPLE 10

Selection of TGC-714 from the data base and analysis of the base sequence

After selection of HGS:1260352 by the similar method as described in EXAMPLE 1, this clone was received as TGC-714 and then the base sequence was
30 confirmed. As the result, it was revealed that the insertion sequence (cDNA) of the clone carried the open reading frame for 372 bases as referred to as SEQ ID NO:25, which encoded the polypeptide comprising 123 amino acid residue as shown by SEQ ID NO:10. The residue consisting of 22 amino acids at N-terminus of the amino acid sequence as shown by SEQ ID NO:10 was anticipated to be the signal sequence for
35 secretion. It was also verified that this clone expressed in epididymis.

The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID NO:25, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g., ATGAAACTCCTGCTGCTGGCTCTTC and TCATGAGCTATGGTGAACATTGGA) were prepared, followed by employment of the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., epididymis, etc.) or RT-PCR with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the cDNA fragment. The reaction conditions to be applied to PCR were those as described in EXAMPLE 1.

EXAMPLE 11

Selection of TGC-715 from the data base and analysis of the base sequence

After selection of HGS:81772 by the similar method as described in EXAMPLE 1, this clone was received as TGC-715 and then the base sequence was confirmed. As the result, it was revealed that the insertion sequence (cDNA) of the clone carried the open reading frame for 492 bases as referred to as SEQ ID NO:26, which encoded the polypeptide comprising 163 amino acid residue as shown by SEQ ID NO:11. The residue consisting of 20 amino acids at N-terminus of the amino acid sequence as shown by SEQ ID NO:11 was anticipated to be the signal sequence for secretion. It was also verified that this clone expressed in epididymis.

The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID NO:26, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g., ATGGGCGGCCTGCTGCTGGCTGCTT and CTACTGTGACAGGAAGCCCAGGCTC) were prepared, followed by employment of the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., epididymis, etc.) or RT-PCR with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the cDNA fragment. The reaction conditions to be applied to PCR were those as described in EXAMPLE 1.

EXAMPLE 12

Selection of TGC-749 from the data base and analysis of the base sequence

After selection of HGS:1379897 by the similar method as described in EXAMPLE 1, this clone was received as TGC-749 and then the base sequence was confirmed. As the result, it was revealed that the insertion sequence (cDNA) of the

clone carried the open reading frame for 906 bases as referred to as SEQ ID NO:27, which encoded the polypeptide comprising 301 amino acid residue as shown by SEQ ID NO:12. The residue consisting of 18 amino acids at N-terminus of the amino acid sequence as shown by SEQ ID NO:12 was anticipated to be the signal sequence for secretion. It was also verified that this clone expressed in T cells, placenta, liver, large intestine, etc.

The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID NO:27, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g., ATGGCCCGGCATGGGTTACCGCTGC and TTACAGCTCCCCTGGCGGCCGGCCT) were prepared, followed by employment of the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., T cells, placenta, liver, large intestine, etc.) or RT-PCR with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the cDNA fragment. The reaction conditions to be applied to PCR were those as described in EXAMPLE 1.

EXAMPLE 13

Selection of TGC-768 from the data base and analysis of the base sequence

After selection of HGS:398232 by the similar method as described in EXAMPLE 1, this clone was received as TGC-768 and then the base sequence was confirmed. As the result, it was revealed that the insertion sequence (cDNA) of the clone carried the open reading frame for 210 bases as referred to as SEQ ID NO:28, which encoded the polypeptide comprising 69 amino acid residue as shown by SEQ ID NO:13. The residue consisting of 26 amino acids at N-terminus of the amino acid sequence as shown by SEQ ID NO:13 was anticipated to be the signal sequence for secretion. It was also verified that this clone expressed in testis.

The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID NO:28, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g., ATGTGCTGGCTGCGGGCATGGGGCC and TTATCTATTTCATCATATATTCTTA) were prepared, followed by employment of the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., testis, etc.) or RT-PCR with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the cDNA fragment. The reaction conditions to be applied to PCR were those as described in EXAMPLE 1.

EXAMPLE 14

Selection of TGC-772 from the data base and analysis of the base sequence

After selection of HGS:2079036 by the similar method as described in EXAMPLE 1, this clone was received as TGC-772 and then the base sequence was confirmed. As the result, it was revealed that the insertion sequence (cDNA) of the clone carried the open reading frame for 210 bases as referred to as SEQ ID NO:29, which encoded the polypeptide comprising 69 amino acid residue as shown by SEQ ID NO:14. The residue consisting of 23 amino acids at N-terminus of the amino acid sequence as shown by SEQ ID NO:14 was anticipated to be the signal sequence for secretion. It was also verified that this clone expressed in pancreas, placenta, etc.

The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID NO:29, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g., ATGGGGTTCCCGGCCGCGGCGCTGC and CTACGCCGAGACCGTGGGCCTGCGG) were prepared, followed by employment of the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., pancreas, placenta, etc.) or RT-PCR with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the cDNA fragment. The reaction conditions to be applied to PCR were those as described in EXAMPLE 1.

EXAMPLE 15

Selection of TGC-790 from the data base and analysis of the base sequence

After selection of HGS:2450362 by the similar method as described in EXAMPLE 1, this clone was received as TGC-790 and then the base sequence was confirmed. As the result, it was revealed that the insertion sequence (cDNA) of the clone carried the open reading frame for 594 bases as referred to as SEQ ID NO:30, which encoded the polypeptide comprising 197 amino acid residue as shown by SEQ ID NO:15. The residue consisting of 26 amino acids at N-terminus of the amino acid sequence as shown by SEQ ID NO:15 was anticipated to be the signal sequence for secretion. It was also verified that this clone expressed in placenta, etc.

The cDNA fragment could be obtained by conventional methods, based on the above information. In other words, using the base sequence as described in SEQ ID NO:30, the primers for PCR corresponding to 5' end and 3' end (e.g., ATGCGAGGTGGCAAATGCAACATGC and TCATAAACTTGTGTTGGGCTTTAGG) were prepared, followed by employment of

the cDNA library of the above-stated tissues (e.g., placenta, etc.) or RT-PCR with use of mRNA derived from the aforementioned tissues as a template to obtain the cDNA fragment. The reaction conditions to be applied to PCR were those as described in EXAMPLE 1.

5

EXAMPLE 16

Secretion expression of TGC-480 product in COS7 cells

The expression vector to express TGC-480 product in animal cells was obtained by insertion of the DNA fragment containing ORF encoding the TGC-480 product into
10 the expression vector pCAN618 for animal cells.

First of all, the PCR was performed by using the synthetic DNA [5'-ACGCTCGAGTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCGTATGGGGCATCTGCCCTTTTTC-3' : (SEQ ID NO:62)], which was designed to locate the synthetic DNA [5'-TCGGAATTCGCCATGGCCAAGTACCTGGCCCAGATC-3' : (SEQ ID
15 NO:61)] having the recognition site for the restriction enzyme Eco RI immediately before the translation start codon initiator, the FLAG sequence consisting of 8 amino acids (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) at C-terminus of the TGC-480 protein, and subsequent stop codon and the recognition site for the restriction enzyme Xho I, by using the cDNA fragment encoding the TGC-480 protein obtained in EXAMPLE 1 as
20 a template. The PCR reaction was performed according the following program, with use of Pyrobest DNA Polymerase (Takara Shuzo Co., Ltd.); namely, the reaction mixture was placed at 94°C for 1 minute, then at 98°C for 10 seconds, at 60°C for 30 seconds and at 72°C for 1 minute; this cycle was repeated 25 times in total. Finally, extension reaction at 72°C for 10 minutes was performed to obtain the DNA fragment
25 containing the ORF of TGC-480. The resultant DNA fragment was cleaved with the restriction enzyme Eco RI and Xho I, followed by insertion of them into Eco RI/Xho I sites in pCAN618 to obtain the expression vector for TGC-480 protein, pCAN618/TGC-480FLAG for animal cells.

In the DMEM (medium ; Gibco BRL) containing 10% FBS (bovine fetal serum) ,
30 4×10^5 COS7 cells were incubated in a 6-well plate for 24 hours. The expression vector pCAN618/TGC480FLAG DNA was introduced into these cells with use of LipofectAMINE (Gibco BRL) and then cultured for further 18 hours. The medium was replaced with Opti-MEM (Medium ; Gibco BRL) containing 0.05% CHAPS and cultured for further 24 hours, followed by recovery of the supernatant. The
35 supernatant was subjected to centrifugation to remove the floating cells, and then

condensed to 1/10 by ultrafiltration (Centricon; Amicon). The resultant solution was added with the same volume of SDS-Sample Buffer containing 2-mercaptoethanol, followed by electrophoresis in 10 – 25% SDS-PAGE (TEFCO). After transferring this to the PVDF membrane (Amersham), Western Blot analysis was performed.

5 Anti-FLAG mouse IgG (10 μ g/ml ; Sigma) was used as the primary antibody while HRP (Horseradish peroxidase)-labeled anti-mouse IgG antibody (x 2000 dilution; Amersham) was used as the secondary antibody, with use of ECLplus Western Blot Detection System (Amersham) for detection. As the result, it was revealed that TGC-480 protein was secreted into the culture supernatant (Fig. 1).

10 EXAMPLE 17

Secretion expression of TGC-623 product in COS7 cells

The expression vector to express TGC-623 product in animal cells was obtained by insertion of the DNA fragment containing ORF encoding the TGC-623 product into

15 the expression vector pCAN618FLAG for animal cells. pCAN618FLAG was derived from the plasmid vector pCAN618, and pCAN618FLAG can express the target protein as the FLAG fused protein, by coinciding the reading frame of the base sequence encoding the FLAG sequence for 8 amino acids existing immediately after Sal I site (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys) to the end codon.

20 First of all, the PCR was performed by using the synthetic DNA [5'-AGGCAAGTCGACAAGATCTTCTCGGTCAAGTTTGGGGTGGCTTCCTGTC TTGGTCAT-3': (SEQ ID NO:68)], which was designed to locate the restriction enzyme Sal I recognition site at C end of TGC-623 protein, and the synthetic DNA [5'-TAGACGAATTCCCACCATGGGACCTGTGCGGTTGGGAATATTGC-3' :

25 (SEQ ID NO:67)] having the recognition site for the restriction enzyme Eco RI immediately before the translation start codon initiator by using the cDNA fragment encoding TGC-623 protein obtained in EXAMPLE 4. The PCR reaction was performed according to the following program, with use of Pyrobest DNA Polymerase (Takara); namely, the reaction mixture was placed at 94°C for 1 minute, then at 98°C

30 for 10 seconds, at 57°C for 30 seconds and at 72°C for 1 minute; this cycle was repeated 25 times in total. Finally, extension reaction at 72°C for 10 minutes was performed to obtain the DNA fragment containing the ORF of TGC-623. The resultant DNA fragment was cleaved with the restriction enzyme Eco RI and Sal I, followed by insertion of them into Eco RI/Sal I sites in pCAN618FLAG to obtain the

35 expression vector for TGC-623 protein, or pCAN618/TGC-623FLAG for animal cells.

This expression vector was introduced into COS7 cells in the similar manners for those in EXAMPLE 16, and the culture supernatant was prepared, thereby performing the Western Blot analysis. As the result, it was revealed that TGC-623 protein was secreted into the culture supernatant.(Fig. 1)

5

EXAMPLE 18

Secretion expression of TGC-711 product in COS7 cells

The expression vector to express TGC-711 product in animal cells was obtained in the similar manner as those for TGC-480 product described in EXAMPLE 16.

10 First of all, the PCR was performed by using the synthetic DNA [5'-ACGCTCGAGTTACTTGTCATCGTCGTCCTTG TAGTCTGAGGCTCCTGCAG AGGTCTGAGA-3': (SEQ ID NO:64)], which was designed to locate the FLAG sequence (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) and subsequently the end codon as well as the recognition site for the restriction enzyme Xho I in this sequence order, and
15 the synthetic DNA [5'-TCGGAATTCGCCATGGCCAGCCTGGGGCTGCTGCTC-3': (SEQ ID NO:63)] having as a template the recognition site for the restriction enzyme Eco RI immediately before the translation start codon initiator, by using the cDNA fragment encoding TGC-711 protein obtained in EXAMPLE 9 as a template. The PCR reaction and subsequent treatments were performed under the similar conditions
20 as those in EXAMPLE 16, to obtain the expression vector for human TGC-711 protein, or pCAN618/TGC-711FLAG for animal cells. This expression vector was introduced into COS7 cells in the similar manners for those in EXAMPLE 16, and the culture supernatant was prepared, thereby being used for performing the Western Blot analysis. As the result, it was revealed that TGC-711 protein was secreted into the culture
25 supernatant (Fig. 1).

EXAMPLE 19

Secretion expression of TGC-714 product in COS7 cells

The expression vector to express TGC-714 product in animal cells was obtained
30 in the similar manner as those for TGC-480 product described in EXAMPLE 16.

First of all, the PCR was performed by using the synthetic DNA [5'-ACGCTCGAGTTACTTGTCATCGTCGTCCTTG TAGTCTGAGCTATGGTGAA CATTGGAAG-3': (SEQ ID NO:66)], which was designed to locate the FLAG sequence (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) and subsequently the end codon as
35 well as the recognition site for the restriction enzyme Xho I in this sequence order, and

the synthetic DNA [5'-TCGGAATTCACCATGAAACTCCTGCTGCTGGCTCTT-3' : (SEQ ID NO:65)] having the recognition site for the restriction enzyme Eco RI immediately before the translation start codon initiator, by using the cDNA fragment encoding TGC-711 protein obtained in EXAMPLE 9 as a template. The PCR reaction was performed according to the following program, with use of Pyrobest DNA Polymerase (Takara); namely, the reaction mixture was placed at 94°C for 1 minute, then at 98°C for 10 seconds, at 55°C for 30 seconds and at 72°C for 30 seconds; this cycle was repeated 25 times in total. Finally, extension reaction at 72°C for 10 minutes was performed to obtain the DNA fragment containing the ORF of TGC-714. The resultant DNA fragment was cleaved with the restriction enzyme Eco RI and Xho I, followed by insertion of them into Eco RI/Xho I sites in pCAN618 to obtain the expression vector for TGC-714 protein, or pCAN618/TGC-714FLAG for animal cells.

This expression vector was introduced into COS7 cells in the similar manners for those in EXAMPLE 16, and the culture supernatant was prepared, thereby being used for performing the Western Blot analysis. As the result, it was revealed that TGC-714 protein was secreted into the culture supernatant.(Fig. 1)

EXAMPLE 20

Secretion expression of TGC-715 product in COS7 cells

The expression vector to express TGC-715 product in animal cells was obtained in the similar manner as those for TGC-623 product described in EXAMPLE 17.

First of all, the PCR was performed by using the synthetic DNA [5'-CTGGGCGTCGACCTGTGACAGGAAGCCCAGGCTCCTGCTCCACT-3' : (SEQ ID NO:70)], which was designed to locate recognition site for the restriction enzyme, or Sal I at C end of the TGC-715 protein, and the synthetic DNA [5'-GTGTAGAATTCCCACCATGGGCGGCCTGCTGCTGGCTGCTTTTCTGGCTT-3' : (SEQ ID NO:69)] having the recognition site for the restriction enzyme Eco RI immediately before the translation start codon initiator, by using the cDNA fragment encoding TGC-715 protein obtained in EXAMPLE 11 as a template. The PCR reaction was performed under the similar conditions as those in EXAMPLE 16, and the obtained DNA fragment was introduced into the Eco RI/Sal I sites of pCAN618FLAG by the similar methods for those in EXAMPLE 17 to obtain the expression vector for human TGC-715 protein, or pCAN618/TGC-715FLAG for animal cells. This

expression vector was introduced into COS7 cells in the similar manners for those in EXAMPLE 16, and the culture supernatant was prepared, thereby being used for performing the Western Blot analysis. As the result, it was revealed that TGC-715 protein was secreted into the culture supernatant.(Fig. 1)

5

INDUSTRIAL APPLICABILITY

The polypeptide of the present invention can be used as the tissue marker, cancer marker, molecular weight marker, pathological marker for the purpose of fundamental studies in the fields, for example, biology, physiology, pharmacology and medicine, as well as for detection of the binding protein to the polypeptide of the present invention. It is anticipated that the polypeptide of the present invention possesses more than one biological activity, for example, including anti-cancer activity, anti-inflammatory activity, hematopoietic activity, anti-coagulation activity, cell migration activity, cell growth stimulating activity, cell differentiation inducing activity, immuno-modulating activity, ligand activity, etc; therefore, the polypeptide of the present invention can be used for diagnosis, treatment and prophylaxis of the diseases due to such effects. Furthermore, the polypeptide of the present invention is useful as the reagent for screening of the compound or its salts that either promotes or inhibits activities of the polypeptide of the present invention. In addition, since the antibody against the polypeptide of the present invention can specifically recognize the polypeptide of the present invention, it can be employed for detection, quantification and neutralization of the polypeptide of the present invention in the test solution.

CLAIMS

1. A polypeptide comprising the same or substantially the same amino acid sequence as at least one amino acid sequence selected among SEQ ID NO:1 or SEQ ID
5 NO:15, or a salt thereof.
2. A manufacturing method for the polypeptide or its salt according to claim 1, which comprises culture of the transformant that was transformed by the recombinant vector containing DNA encoding the polypeptide described in claim 1, and production of the polypeptide.
- 10 3. An antibody to the polypeptide or its salt according to claim 1.
4. A method of screening a compound or its salt that either promotes or inhibits activities of the polypeptide or its salts according to claim 1, which comprises using the polypeptide or its salt according to claim 1.
5. A kit for screening a compound or its salt that either promotes or inhibits
15 activities of the polypeptide or its salts according to claim 1, which comprises the polypeptide or its salt according to claim 1.
6. A compound or its salt that either promotes or inhibits activities of the polypeptide or its salt according to claim 1, which can be obtained by the screening method according to claim 4 or the kit for screening according to claim 5.
- 20 7. A pharmaceutical comprising a compound or its salt that either promotes or inhibits activities of the polypeptide or its salts according to claim 1, which can be obtained by the screening method according to claim 4 or the kit for screening according to claim 5.
8. A pharmaceutical composition comprising the polypeptide or its salt according to
25 claim 1.

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

5 The present invention relates to a novel secretory protein or salts thereof, methods of manufacturing the protein, a pharmaceutical composition comprising the protein, an antibody to the protein, screening methods/screening kits for a compound or salts thereof that promotes or inhibits activities of the protein, etc.

10 The protein of the present invention can be used as prophylactic/therapeutic agents for various diseases such as cancer, immunological diseases, pulmonary dysfunction, liver dysfunction, infection or gastrointestinal disorders, etc. The antibody of the present invention can be used for quantification of the protein of the present invention in the test solution. Furthermore, the protein of the present invention is useful as the reagent for screening a compound that either promotes or inhibits activities of the protein of the present invention.

THIS PAGE BLANK (USPTO)